

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STÉFANI CIBELE ROSSI

**Estudo ecotoxicológico da exposição ao chumbo e à nanopartícula de dióxido
de titânio em *Hoplias malabaricus***

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STÉFANI CIBELE ROSSI

Estudo ecotoxicológico da exposição ao chumbo e à nanopartícula de dióxido de titânio em *Hoplias malabaricus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção de título de Doutor.

Orientadora: Dra Helena da Silva de Assis
Co-orientador: Dr. Ciro Alberto de Oliveira
Ribeiro

CURITIBA

2013

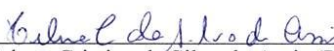



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia




PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO E À NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM *Hoplias malabaricus*”, de autoria da pós-graduanda **STEFANI CIBELE ROSSI**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis e banca composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis (Presidente - Farmacologia - UFPR), Prof.^a Dr.^a Carolina Arruda de Oliveira Freire (Fisiologia – UFPR), Prof. Dr. Francisco Filipak Neto (Biologia Celular – UFPR), Dr.^a Inês da Silva Rabitto (Farmacologia – UFPR) e Prof.^a Dr.^a Lígia Maria Salvo (Biologia Celular – USP), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 27 de março de 2013.


Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis (Presidente - Farmacologia - UFPR)


Prof.^a Dr.^a Carolina Arruda de Oliveira Freire (Fisiologia – UFPR)


Prof. Dr. Francisco Filipak Neto (Biologia Celular – UFPR)


Dr.^a Inês da Silva Rabitto (Farmacologia – UFPR)


Prof.^a Dr.^a Lígia Maria Salvo (Biologia Celular – USP)

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1693 – Fax (41) 3266-2042 – pgfarmacologia@ufpr.br
<http://farmacologia.bio.ufpr.br/posgraduacao>

DEDICATÓRIA e AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, sempre...“és parte ainda do que me faz forte”(Legião Urbana),

À minha mãe, aos meus irmãos, e às minhas estrelinhas, Ana Clara e Sara “de todos os amores e amigos, de vocês me lembro mais, de vocês não esqueço jamais”(Beatles), vocês são meu tudo, meu porto seguro, pra onde eu volto sempre!

À todos os meus amigos, que tornaram esse caminho menos árduo, “enquanto houver vocês do outro lado, aqui do outro eu consigo me orientar” (Teatro Mágico)

Ao meu amor Rafael, porque “das habilidades que o mundo sabe, essa ainda é a que faz melhor: dar voltas” (José Saramago), “resistindo a tudo, seremos dois velhos felizes de mãos dadas numa tarde de sol.. pra sempre, Te amo” (Vanessa da Mata)!

À professora Helena Cristina da Silva Assis pela orientação,

A CAPES pelo apoio financeiro.

EPIGRAFE

“O homem é parte da natureza e sua guerra contra ela é inevitavelmente uma guerra contra si mesmo... Temos pela frente um desafio como nunca a humanidade teve, de provar nossa maturidade e domínio, não da natureza, mas de nós mesmos”

Rachel Carson

“Uma coisa aprendi na minha longa vida: que toda a nossa ciência, contraposta à realidade, é primitiva e infantil. E, apesar disso, é a coisa mais preciosa que temos”.

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ilustração da espécie popularmente conhecida como traíra, *H. malabaricus*

FIGURA 2 - Principais sistemas antioxidantes enzimáticos e radical hidroxila sendo gerado via reação de fenton

FIGURA 3 - Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação

FIGURA 4 - *H. malabaricus* em processo de anestesia, benzocaína alcoólica 1%

FIGURA 5 - Sonda de gavagem para ratos, utilizada para gavagem nos peixes

FIGURA 6 - *H. malabaricus* anestesiado, recebendo gavagem

FIGURA 7 - *H. malabaricus* anestesiado, recebendo alimento

TABELA 1 - Disposição dos indivíduos nos grupos experimentais.

ARTIGO I

TABELA 1 – Atividade de enzimas antioxidantes no fígado de *H. malabaricus* (SOD, CAT, GR, GPx, GSH, G6PDH e GST)

FIGURA 1- (A) Peroxidação lipídica (B) Carbonilação de proteínas - fígado de *H. malabaricus*

FIGURA 2 - Atividade da δ -ALAd - fígado de *H. malabaricus*

FIGURA 3 - Metalotioneínas - fígado de *H. malabaricus*.

ARTIGO II

FIGURA 1 - (A) Atividade da alanina aminotransferase (ALT) e (B) Atividade da aspartato aminotransferase - fígado de *H. malabaricus*

FIGURA 2 - Histopatologia, diferentes achados em A, B, C e D - fígado de *H. malabaricus*

FIGURA 3 - Índice de danos histopatológicos determinados de acordo com Bernet *et al* - fígado de *H. malabaricus*

FIGURA 4 – Autometalografia, depósitos de metal - fígado de *H. malabaricus*

FIGURA 5 - Concentração de serotonina no cérebro de *H. malabaricus*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT - alanina aminotransferase

δ-ALAd - delta-aminolevulinato desidratase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST - aspartato aminotransferase

CAT - catalase

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - ácido desoxirribonucleico

DDT - dicloro-difenil-tricloroetano

DA - dopamina

EPA - Environmental Protect Agency

ERO - espécies reativas de oxigênio

ERN - espécies reativas de nitrogênio

G6PDH – glucose 6-fosfato desidrogenase

GPx - glutational peroxidase

GR - glutational redutase

GSH - glutational

GST - glutational S-transferase

GSSG - glutational dissulfeto

5-HT - serotonina

LPO - peroxidação lipídica

MT - metalotioneína

MCO - oxidação catalisada por metais

NA - noradrenalina

NADPH - nicotinamida-adenina-dinucleotidi-fosfato

NP - nanopartícula

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCO - proteínas carboniladas

SOD - superóxido dismutase

TNF - fator de necrose tumoral

WHO - World Health Organization.

RESUMO

O aumento do uso de nanomateriais em diversos produtos nas diferentes áreas, tais como eletrônicos, cosméticos, alimentos e medicamentos tem atraído a atenção da comunidade científica devido as propriedades desconhecidas desses materiais, tais como a cinética no ambiente e a interação com outras substâncias presentes no mesmo. Apesar de diferentes estudos terem demonstrado baixa toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2), outros apontam para um possível efeito modulador da mesma sobre a toxicidade de outros contaminantes ambientais. Desta forma, o presente estudo avaliou os possíveis efeitos interativos entre os contaminantes chumbo (Pb) e a nanopartícula de TiO_2 , através de exposição por via trófica no teleósteo nativo *Hoplias malabaricus*. Diferentes biomarcadores foram utilizados, como análises de danos às biomoléculas, estresse oxidativo, parâmetros bioquímicos plasmáticos, histopatológicos, autometalografia, análise de neurotransmissores e do Pb no músculo. A interação entre o Pb e a nano TiO_2 parece ter diminuído a disponibilidade do Pb para interagir com alguns componentes celulares. Essa interação pode ter evitado o aumento das atividades da glucose-6-fosfato desidrogenase e glutathione S-transferase e os níveis de metalotioneína, bem como a inibição da atividade da delta-aminolevulinato desidratase. Porém, outros biomarcadores como a glutathione redutase, e até mais tardios quanto ao dano como a histopatologia, foram afetados apenas no grupo co-exposto (Pb + TiO_2). Outros ainda foram alterados tanto nos grupos isolados quanto nos co-expostos como a concentração de serotonina cerebral e atividade da alanina aminotransferase. Estes resultados indicam uma interação, química ou de outra natureza, entre o Pb e a nano TiO_2 , porém este mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado.

Palavras chave: *H. malabaricus*, chumbo, nanopartícula TiO_2 , exposição trófica, toxicidade crônica.

ABSTRACT

The increased use of nanomaterials in several products in different areas such as electronics, cosmetics, food and medicinal products has attracted the attention of the scientific community due the unknown properties of these materials, such as kinetic and interaction with other substances in the environment. Although several studies have demonstrated low toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles, others have indicated a possible modulatory effect on the toxicity of other environmental contaminants. The present study evaluated the possible interactive effects of the contaminants lead (Pb) and nanoparticle TiO₂ via trophic in fish native species *H. malabaricus*. Different biomarkers were used as analysis of damage to biomolecules, oxidative stress, biochemical parameters, histopathological, autometallography, analyses of neurotransmitters, and of Pb in muscle. The interaction between Pb and nano TiO₂ suggested a decreasing in the availability of Pb to interact with some cellular components. This interaction may have avoided the increase of the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione S-transferase, metallothionein, as well as inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase activity. However, biomarkers such as glutathione reductase, and histopathology were affected only in the co-exposed group Pb + TiO₂. Other biomarkers were altered in the isolated and co-exposed groups as the concentration of brain serotonin and plasma alanine aminotrasferase activity. The results indicated an interaction (chemical or not), between Pb and nano TiO₂, but more studies are needed to elucidate the mechanoism of action.

Keywords: *H.malabaricus*, lead, TiO₂ nanoparticle, trophic exposure, chronic toxicity.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 NANOTECNOLOGIA	14
1.2 NANOPARTÍCULA de DIÓXIDO de TITÂNIO (nano TiO ₂)	15
1.3 CHUMBO (Pb)	17
1.4 BIOINDICADOR - <i>H. malabaricus</i>	20
1.5 BIOMARCADORES	21
1.5.1 Metabolismo	21
1.5.2 Estresse oxidativo	22
1.5.3 Danos às biomoléculas	25
1.5.4 Metalotioneínas (MTs)	27
1.5.5 Delta-aminolevulinico desidratase (δ-ALAd)	27
1.5.6 Aminotransferases	27
1.5.7 Neurotransmissores	28
1.5.8 Histopatologia	29
1.6 ESCOLHA DAS DOSES	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 METODOLOGIA	33
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
ARTIGO I	37
Abstract	38
1 Introduction	39
2 Materials and Methods	41
3 Results and Discussion	45
4 Conclusions	52
References	52
ARTIGO II	60
Abstract	61
1 Introduction	62
2 Materials and Methods	63
3 Results	67
4 Discussion	70
Conclusion	73
References	74
4 DISCUSSÃO GERAL	81
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Toxicologia Ambiental e Ecotoxicologia são termos empregados para descrever o estudo dos efeitos adversos causados por substâncias químicas liberadas no ambiente sobre os organismos vivos (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

A medida que a humanidade aumentou a capacidade tecnológica de intervir na natureza, para satisfazer suas necessidades crescentes, surgiram os conflitos quanto ao uso do espaço, recursos e disposição dos resíduos no ambiente. Nos dois últimos séculos, o modelo de civilização que se impôs trouxe a industrialização como forma de produção e organização de trabalho. Como consequência, houve a disponibilidade de uma grande quantidade de produtos químicos potencialmente tóxicos, e a geração de resíduos em quantidade prejudicial ao ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Entretanto, a poluição aquática não teve atenção, até que um limite fosse atingido e a partir do qual foi possível perceber consequências adversas nos ecossistemas e organismos, de forma que somente a partir de 1960 a poluição se tornou um fato reconhecido internacionalmente (FREIRE *et al.*, 2008).

O livro de Rachel Carson, intitulado Primavera Silenciosa - Silent Spring - publicado em 1962, teve importante papel no alarme destes efeitos, ele levantou pela primeira vez a ideia de que substâncias usadas como praguicidas, tais como o DDT, poderiam apresentar efeitos nocivos também para espécies não alvo, como o ser humano e as aves das quais estes poluentes estariam “silenciando” o canto. O principal argumento usado por ela era o fato de os sistemas biológicos compartilharem muitos mecanismos bioquímicos, portanto todos seriam potenciais alvos para estas substâncias. Tal publicação resultou em investigação dos possíveis efeitos do DDT, e posteriormente a sua proibição. Com isso, a criação de leis estaduais e federais nos Estados Unidos (EUA) ganhou impulso e culminou em 1970 com a criação no Congresso Nacional da Lei de Política Nacional Ambiental que instituiu a EPA (Agência de Proteção Ambiental) (FUKUSHIMA e AZEVEDO, 2008).

Desde então, a criação cada vez mais rápida de novas tecnologias, tem sido acompanhada pela preocupação em se entender a dinâmica das mesmas nos diferentes ecossistemas, e o efeito tóxico resultante da disposição de seus resíduos. Segundo Monserrat (2007) a poluição resulta, de maneira direta ou indireta, da

introdução antrópica de moléculas ou energia que induzem efeitos deletérios aos diferentes organismos. Os ecossistemas aquáticos têm sido considerados importantes depósitos finais para uma variedade de poluentes, e consequentemente os organismos ali presentes estão expostos a misturas destes, como resíduos industriais, urbanos, resultantes de acidentes, provenientes da agricultura, entre outros.

Efeitos deletérios sobre as populações muitas vezes são difíceis de serem detectados, já que muitos tendem a se manifestar apenas após longos períodos. Desta forma, quando o efeito finalmente se torna visível, o processo destrutivo pode ter ido além do ponto em que poderia ser revertido por ações corretivas ou de redução de risco (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Assim, o uso de respostas precoces frente a exposição aos poluentes tornou-se a principal ferramenta para avaliação de risco ambiental. Tais ferramentas, conhecidas como biomarcadores, podem ser definidas como alterações em respostas biológicas, desde moleculares, celulares, fisiológicas até mudanças comportamentais, que podem ser relacionadas com a exposição, ou efeitos tóxicos de poluentes ambientais (PEAKALL, 1994).

Um dos maiores desafios da atualidade na questão ambiental é o conhecimento dos efeitos relacionados a exposições simultâneas. Sabemos que os contaminantes não se encontram isolados no ambiente (sedimento, coluna d'água, material particulado ou mesmo nos diferentes níveis tróficos), e muito menos que estes são absorvidos pela biota isoladamente. Na realidade temos uma variedade de compostos a que os organismos encontram-se expostos e uma gama de associações do tipo antagônicas e/ou sinérgicas. Desta forma, no presente trabalho tivemos como objetivo os possíveis efeitos tóxicos interativos entre o metal chumbo (Pb) e a nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂), sobre a espécie de peixe nativa *Hoplias malabaricus* exposta por via trófica. Com esta situação tentamos nos aproximar o máximo da realidade, já que ambos são sabidamente poluentes aquáticos e podem ser concomitantemente encontrados (RONG ZHANG *et al.*, 2010; RECILLAS *et al.*, 2011).

1.1 NANOTECNOLOGIA

As primeiras idéias acerca do tema miniaturização foram apresentadas em uma palestra proferida pelo físico americano Richard Feynman em 1959 no Instituto de Tecnologia da Califórnia, intitulada como “Há muito espaço lá embaixo”, onde o mesmo propôs que no futuro seria possível a manipulação de materiais em escala atômica. Porém, um significativo desenvolvimento só ocorreu nos anos 80 com a invenção do microscópio de tunelamento e posteriormente do microscópio de força atômica que possibilitaram observar e analisar estruturas e compostos na escala nanométrica, bem como colaboraram para o desenvolvimento dos nanotubos de carbono e de nanocristais semicondutores (CADIOLI e SALLA, 2006).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA, 2007) nanotecnologia é definida como a pesquisa e desenvolvimento tecnológico a níveis atômico, molecular, ou macromolecular, utilizando uma escala de comprimento de 1-100 nanômetros em qualquer dimensão. Bem como, a criação e uso de estruturas, dispositivos e sistemas que têm novas propriedades e funções, devido seu tamanho pequeno, ou seja, a capacidade de controlar ou manipular a matéria em uma escala atômica.

Em dimensões nanométricas a proporção área/volume sofre grande aumento, o que faz com que o número de átomos na superfície do material também aumente, enquanto menos de 1% dos átomos ocupam a superfície em micropartículas, em torno de 10 a 40% ocupam esta região em uma nanopartícula de metal de 10 nm de diâmetro (NEL *et al.*, 2006; GRAINGER e CASTIN, 2008), como resultado a matéria pode apresentar características físico-químicas diferentes daquelas observadas sob escala micro ou macro. Sendo assim, a característica mais marcante dos nanomateriais é que nessas dimensões eles geralmente exibem um comportamento físico (propriedades ópticas, eletrônicas, mecânicas e magnéticas) diferente do observado para o material *bulk*. Intervenções nessas propriedades permitem a criação de dispositivos com funcionalidade e características reforçadas ou até mesmo completamente novas. Alguns exemplos desse novo comportamento são: aumento da força e dureza, materiais cerâmicos mais maleáveis e fortes, redução da permeabilidade de materiais magnéticos e mudança na estrutura eletrônica de semicondutores (GOMES, 2009).

Em relação às dimensões, os nanomateriais são classificados em três categorias: 2D, materiais que possuem apenas uma dimensão física na escala nanométrica; 1D, aqueles em que duas dimensões estão na escala nanométrica; e 0D, onde temos as três dimensões do material com tamanho menor que 100 nm, como é o caso das nanopartículas.

Estima-se que em 2015, mais de 15% de todos os produtos no mercado mundial terão algum tipo de nanotecnologia incorporada ao seu processo de produção (DAWSON, 2008). Consequentemente, os ambientes naturais vêm sendo contaminados por produtos e resíduos nanotecnológicos, seja durante os processos de produção, transporte e utilização, tanto de maneira direta quanto indiretamente por descarte dos produtos consumidos (THE ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; MUELLER e NOWACK, 2008). Dentre os diferentes tipos de nanopartículas, os nanometais como prata (Ag), zinco (Zn), titânio (Ti) e seus óxidos têm sido amplamente utilizados em diversas áreas. Em especial, o óxido de titânio (TiO_2), nanopartícula investigada neste trabalho, é utilizado em tintas (“branco titânio”), papel, plástico, roupas, como aditivo de alimentos, em muitos produtos cosméticos como, por exemplo, protetor solar e na remediação ambiental por sua atividade fotocatalítica (MACH, 2004; OBERDORSTER *et al.*, 2005; ADAMS *et al.*, 2006).

A preocupação com relação à toxicidade das nanopartículas reside principalmente no fato de que estas nunca foram produzidas e utilizadas em produtos comerciais em tão larga escala como atualmente e então, o risco de alcançarem os diferentes compartimentos ambientais (atmosfera, águas e solo) e se tornarem disponíveis é real (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

1.2 NANOPARTICULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (nano TiO_2)

O dióxido de titânio (TiO_2) em forma nanoestruturada tem atraído bastante interesse em várias áreas por possibilitar vários tipos de aplicações, sendo empregado em vários ramos da indústria. Essas aplicações são baseadas nas propriedades elétricas e óticas do TiO_2 , que é um semicondutor com *gap* de energia na região ultravioleta. Além disto, o TiO_2 é um material transparente e possui alto

índice de refração. É encontrado na natureza sob diferentes formas cristalinas, sendo as mais conhecidas o rutilo, anatase e brookita. A fase rutilo é a mais termodinamicamente estável em altas temperaturas. Enquanto isso, anatase e brookita são obtidas em temperatura mais baixa, sendo a brookita estável em condições específicas de pressão. A anatase é a fase mais estável na escala nanométrica, portanto a fase mais usada em aplicações de nanotecnologia (BRANDÃO, 2010).

Existem registros de produtos que contêm nanopartículas de TiO_2 nas mais diversas áreas como, por exemplo, as indústrias alimentar, cosmética, do papel, farmacêutica, das tintas, dos plásticos e têxtil (PEREIRA, 2010).

O extenso uso destas partículas aumenta a probabilidade das mesmas serem encontradas no ambiente aquático seja por acidentes durante a produção e o transporte, resíduos de produção (líquidos, sólidos ou gasosos), desgaste e perdas durante o ciclo de vida dos produtos, ou pela disposição inadequada ao final da sua vida útil. Como exemplo, temos o estudo de Kaegi *et al.* (2008) demonstrando que nanopartículas sintéticas de TiO_2 , utilizadas na pintura de fachadas de edifícios, quando expostas às condições climáticas podem libertar-se por ação das chuvas e infiltrar-se em ambientes aquáticos.

Embora ainda seja difícil quantificar a sua concentração no meio ambiente, existem predições das mesmas, como a feita no artigo “Ecotoxicity of nanosized TiO_2 : Review of *in vivo* data” (MENARD *et al.*, 2011), segundo o mesmo estas devem estar presentes em águas na ordem de 0,7-16ug/L. Apesar de diferentes artigos relatarem baixa toxicidade da nanopartícula TiO_2 em organismos vertebrados (WANG *et al.*, 2011; KAHRU e DUBOURGUIER, 2010; MENARD *et al.*, 2011), já foi observado que nanopartículas metálicas por terem uma superfície mais reativa, podem adsorver em suas superfícies outros poluentes, como íons metálicos, os quais acabam sendo endocitados juntamente com a partícula. Uma vez dentro das células, estes poluentes podem ser liberados das nanopartículas, que funcionam assim como “cavalos-de-Tróia” facilitando a absorção de outros poluentes (HURT *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2009).

A absorção de nanopartículas pela inalação ou ingestão parece ser a principal via de entrada destas moléculas em organismos terrestres (BRIGGER *et al.*, 2002). Entretanto, para os animais aquáticos, parecem existir outras rotas de entrada como absorção direta pelas brânquias e pela superfície epitelial. A nível

celular, a maior parte da internalização ocorre via endocitose ou através da superfície celular envolvendo os —“*lipid rafts*” associados às caveolas que evitam a degradação do material internalizado pelo sistema endossoma/lisossoma (PANYAM *et al.*, 2003).

1.3 CHUMBO (Pb)

Existem registros de que os chineses extraíam e produziam o chumbo na forma metálica em 3.000 a.C. e os fenícios exploravam seus depósitos minerais na Espanha desde 2.000 a.C. Os primeiros relatos de contaminação por metais datam da idade média resultando das atividades mineradoras (VINK *et al.*, 1999).

Desde a antiguidade o chumbo é fundido e utilizado sozinho ou junto a outros metais na fabricação de armas e utensílios domésticos como copos, taças e recipientes para líquidos e alimentos, além de aquedutos e reservatórios para fermentação e acondicionamento de bebidas alcoólicas. Durante o império romano foi utilizado, na forma de óxidos, na conservação e correção do gosto de vinhos. Além disso, os romanos utilizavam o metal para a fabricação de canos, no século III a.C. e, ainda hoje, esses canos de chumbo continuam presentes em casas mais antigas e outras edificações erguidas antes de 1978 (CAPITANI *et al.*, 2009). É um metal com largo uso industrial em função de suas características físico químicas, como baixo ponto de fusão (327°C), densidade elevada, maleabilidade, resistência a radiações ionizantes e formação de ligas com outros metais. Todas as ligas metálicas formadas com estanho, cobre, arsênio, antimônio, bismuto, cádmio e sódio apresentam importantes aplicações industriais, como por exemplo, soldas, fusíveis, material de tipografia, material de antifricção e revestimentos de cabos elétricos. A ductilidade única do chumbo o torna particularmente apropriado para sua utilização como forro para cabos de telefone e de televisão, pois ele pode ser estirado para formar um revestimento contínuo em torno dos condutores internos (CAPITANI *et al.*, 2009).

As maiores causas que resultaram na dispersão generalizada do chumbo em todo o meio ambiente, foram decorrentes da sua utilização como um aditivo da gasolina (tetraetil chumbo), e como pigmento em tintas de interior e exterior. Embora

o uso do chumbo em tintas tenha sido proibido em 1978, e seu uso como aditivo da gasolina gradativamente diminuído e então banido em 1995 nos Estados Unidos, a contaminação ambiental decorrente destas ainda permanece, devido a sua alta persistência. Desde a proibição do uso de chumbo na gasolina, as suas emissões para a atmosfera diminuíram significativamente, cerca de 93% no período de 21 anos de 1982-2002 (ATSDR, 2007) .

No Brasil, a produção de chumbo metálico foi importante até a década de 90, quando duas grandes fundições primárias utilizadas no refino do minério extraído na Bahia e em Adrianópolis-PR fecharam suas atividades industriais em 1996. Desde então a produção nacional do metal tem declinado, representando não mais de 8% do total de chumbo consumido no país por ano. Atualmente calcula-se que cerca de 90% do consumo nacional de chumbo metálico provenha de atividades de reciclagem. Os maiores consumidores de chumbo no país são as indústrias de baterias automotivas (80%), seguidos das indústrias de pigmentos com 12% e o setor eletroeletrônico (solda e ligas) com 8% (PAOLIELLO, 2007).

Dos lançamentos conhecidos de chumbo para o ambiente aquático, os mais significantes são os das indústrias de aço, de ferro e produção de chumbo. Esgoto urbano e deposição atmosférica são também importantes fontes indiretas de chumbo encontrados no ambiente aquático (EPA, 1982).

Metais como ferro, cobre, zinco e manganês, são ditos metais essenciais por terem importantes papéis em sistemas biológicos, embora possam causar toxicidade em altas concentrações. Entretanto, metais como o mercúrio, o chumbo e o cádmio são tóxicos mesmo em concentrações baixas, por isso muitas vezes são denominados metais traço (TÜRKMEN *et al.*, 2008). Em um estudo realizado por Guedes *et al.* (2005), os autores encontraram teores de Pb acima dos limites permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2008) no rio Jundiá (Macaíba – Rio Grande do Norte) o valor máximo para este metal é 0,01 mg/L, e o encontrado foi 0,19 mg/L. Em outro estudo, realizado na micro bacia de Caetés (Paty do Alferes – Rio de Janeiro) os valores deste metal mais uma vez estavam acima do limite permitido, tendo sido encontrado 0,08 mg/L (RAMALHO *et al.*, 2000). Também no Paraná, os valores estavam acima do permitido, Santos *et al.* (2008) detectou 0,1 mg/L de Pb nas águas do rio Ivaí (municípios Icaraíma,

Herculândia e Tapira - PR). De modo que podemos perceber que o metal em questão está presente no ambiente aquático de forma significativa, configurando relevante preocupação no país como um todo e em nosso estado, o que justifica o estudo dos mecanismos de toxicidade do mesmo, principalmente sobre a ótica de a coexposição com outro poluente poder modular estes efeitos sobre organismos provenientes deste compartimento ambiental.

A biodisponibilidade e a toxicidade de poluentes metálicos, estão relacionadas à forma química da substância, em geral, o íon metálico livre é a forma mais tóxica à vida aquática (FLORENCE E BATLEY, 1980). A absorção de metais em peixes pode se dar principalmente através de duas vias: trato gastrintestinal (exposição pela dieta) e superfície branquial (exposição hídrica) (PTASHYNKI *et al.*, 2002), neste trabalho simulamos a exposição através da dieta (também dita trófica), ou seja, via trato gastrintestinal.

As concentrações de metais nos tecidos de peixes normalmente são mais altas no fígado que no músculo (TURKMEN *et al.*, 2008), e dependem de fatores como a espécie e o local de coleta. No músculo de peixes, diferentes estudos mostram concentrações de Pb desde 0,21 até 1,28 mg/kg, já no fígado as concentrações variam de 0,40 até 7,15 mg/kg de Pb (Turkmen *et al.*, 2008; Tepe *et al.*, 2007; Dural *et al.*, 2007; Tapia *et al.*, 2006; Turkmen *et al.*, 2006).

A exposição crônica a metais causa mudanças fisiológicas e comportamentais, incluindo perda de apetite, redução do crescimento, perda de íons, e mortalidade em organismos marinhos (SLOMAN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2007). Além disto, interações bioquímicas com estes metais podem modular o efeito tóxico de outros poluentes (PANDEY *et al.*, 2008). O Pb é capaz de alterar funções biológicas e ser tóxico a organismos aquáticos mesmo em baixas concentrações, levando a um desbalanço da ionorregulação e homeostase do Ca^{2+} (ROGERS *et al.*, 2003), alterações em parâmetros hematológicos como diminuição dos leucócitos totais, média do volume celular, número de eritrócitos e do hematócrito (ATES *et al.*, 2008), mudanças morfológicas no fígado como hemosiderose e necrose, e áreas de edema e hemorragia no cérebro (ADEYEMO, 2008), etc.

O chumbo é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos elementos químicos mais perigosos à saúde humana (VANZ *et al.*, 2003).

Em altas doses ocorrem danos a quase todos os órgãos e sistemas orgânicos, os mais importantes sendo o sistema nervoso central, rins e sangue, culminando frequentemente com a morte. Em doses baixas, a síntese do grupamento heme e outros processos bioquímicos são afetadas, e funções neurocomportamentais e psicológicas são prejudicadas, dentre uma variedade de outros efeitos.

1.4 BIOINDICADOR – *Hoplias malabaricus*

Dentre as espécies existentes, os peixes são importantes modelos nos estudos ecotoxicológicos, visto que são os vertebrados mais diversos e abundantes do planeta, ocupam nichos variados, fazem parte da dieta humana e vivem em ecossistemas aquáticos, que são considerados como importante receptor final da grande maioria dos poluentes. Considerando a literatura científica disponível, observamos atualmente uma carência muito grande no Brasil de dados relacionados aos efeitos de poluentes em espécies nativas.

Hoplias malabaricus (BLOCH, 1794), pertence à ordem Characiformes e à família Erythrinidae, popularmente conhecida como traíra, é uma espécie teleóstea predadora, amplamente distribuída pelas águas doces da América do sul, habita preferencialmente ambientes lênticos e apresenta comportamento territorialista. Esta espécie é onívora durante o primeiro ano de desenvolvimento, com uma dieta que compreende microcrustáceos, algas e insetos aquáticos, e torna-se carnívora na fase adulta. Por ocupar altos níveis na cadeia trófica tem considerável valor como modelo de estudo para ecotoxicologia brasileira (FILIPAK NETO *et al.*, 2007). Ilustração de um exemplar de *H. malabaricus* (fig.1).

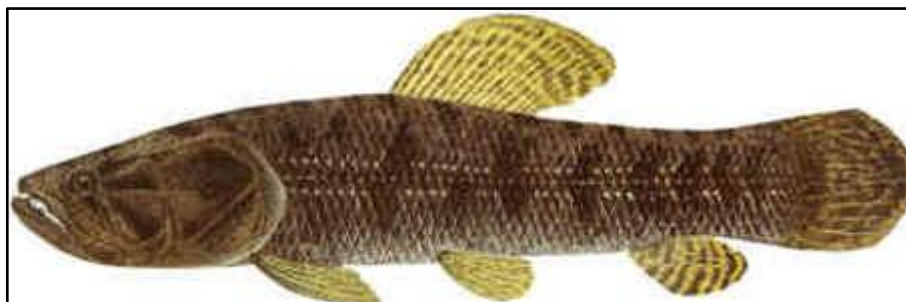


Figura 1: ilustração da espécie popularmente conhecida como traíra, *H. malabaricus*.

Autoria: Alvaro Nunes

1.5 BIOMARCADORES

1.5.1 Metabolismo

A transformação metabólica dos compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar a interação entre o elemento químico e a célula. O metabolismo ou biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos, os quais atuam em diversos tipos de substratos. Muitas destas enzimas têm em comum a função de converter estruturas tóxicas para menos tóxicas, e converter químicos lipofílicos em estruturas hidrofílicas, que são mais rapidamente excretadas. As enzimas envolvidas no metabolismo podem ter sua atividade induzida ou inibida por xenobióticos, o que pode servir como potente biomarcador de exposição a estas substâncias (HANG *et al.*, 2004).

O metabolismo envolve dois tipos de reações bioquímicas, conhecidas como reações de fase I e reações de fase II. Com frequência, mas não invariavelmente essas reações ocorrem sequencialmente.

As reações de fase I são catabólicas (oxidação, redução, hidrólise), e com frequência os produtos são quimicamente mais reativos e, portanto, paradoxalmente, algumas vezes mais tóxicos ou carcinogênicos que a substância

original. As reações de fase II são anabólicas, e envolvem conjugação, que habitualmente resultam em produtos inativos, embora haja exceções (HANG *et al.*, 2004). Com frequência, as reações de fase I introduzem um grupo relativamente reativo, como o hidroxila. A seguir este grupamento, atua como ponto de ataque para o sistema de conjugação (HANG *et al.*, 2004).

A enzima glutathione S-transferase (GST), tratada neste trabalho, pertence à fase II do metabolismo sendo responsável pela conjugação de componentes eletrofílicos ou oriundos da fase I com a glutathione reduzida (GSH) (VAN DER OOST *et al.*, 2002). A família das enzimas GSTs é caracterizada por ter uma ampla especificidade de substrato com baixa afinidade. Esta baixa eficiência catalítica teve importante papel na evolução das GSTs como agente desintoxicador de amplo espectro, tanto de componentes endógenos quanto exógenos (TEW e RONAI, 1999). A atividade desta enzima pode ser indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que ela utiliza como cofator o GSH, e este também participa da degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da atuação da enzima glutathione peroxidase (GPx), para isso a associação de outros biomarcadores de estresse oxidativo são necessários.

1.5.2 Estresse oxidativo

Denomina-se radical livre toda molécula ou íon que possui um elétron ímpar em sua órbita externa. Este elétron livre favorece a recepção de outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reativos, inclusive com moléculas orgânicas. Os radicais livres têm vida média de milésimos de segundo, mas eventualmente podem tornar-se estáveis ao reagirem com biomoléculas. Espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) são compostos igualmente reativos quanto os radicais livres, porém nem sempre possuem elétrons desemparelhados na órbita externa, e portanto não podem ser classificados como radicais livres, sendo então chamadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), um exemplo é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As espécies reativas são normalmente produzidas

pelas células durante os processos metabólicos, entretanto, sob condições normais nosso organismo possui enzimas protetoras, ou antioxidantes que reparam 99% dos danos causados pela oxidação (ROVER *et al.*, 2001).

Situações em que o metabolismo está aumentado, principalmente por exposição a xenobióticos, habitualmente elevam os níveis de espécies reativas podendo levar ao que chamamos de estresse oxidativo, condição onde há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a remoção destas por parte dos sistemas de defesa antioxidante. Muitos contaminantes ambientais (ou seus metabólitos) têm sido relatados por causar estresse oxidativo (VAN DER OOST *et al.*, 2002), e ainda, segundo Livingstone (2001) o dano oxidativo pode ser o principal mecanismo de toxicidade dos poluentes. Os efeitos mediados pela oxidação, assim como suas respostas adaptativas, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e concentração de componentes não enzimáticos, são potentes biomarcadores de toxicidade (VAN DER OOST *et al.*, 2002). Os dois principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos (fig. 2) e não enzimáticos, como o β caroteno, α tocoferol, ácido ascórbico entre outros (ROVER *et al.*, 2001). Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas superóxido dismutase (SOD), dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} ou Mn como cofatores, a catalase (CAT) bem como as enzimas envolvidas no ciclo redox da glutathione (GSH), particularmente a glutathione peroxidase (GPx).

A enzima superóxido dismutase (SOD) atua dismutando 2 ânions superóxidos em um peróxido de hidrogênio, o que aconteceria normalmente em pH fisiológico, porém é acelerada por essa enzima. Pode ocorrer em 3 formas dependendo do metal associado a ela (Cu e Zn no citoplasma de eucariontes, Mn na matriz mitocondrial e Fe em bactérias) (SCANDALIOS, 2005).

A catalase que é uma enzima intracelular localizada no peroxissomo, contendo grupo heme, que facilita a remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), metabolizando este em oxigênio (O_2) e água (H_2O) (VAN DER OOST *et al.*, 2002). O peróxido de hidrogênio é um exemplo de espécie reativa de oxigênio, que assim como os radicais livres são formados durante o metabolismo oxidativo e de xenobióticos.

A glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e dissulfeto (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (TORRES *et al.*, 2004). A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento SH, presente na cisteína (TORRES *et al.*, 2004). A enzima GPx localiza-se no citosol e na matriz mitocondrial, e é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares. A enzima GPx possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. Outra enzima que age conjuntamente com a glutathiona peroxidase é a enzima glutathiona redutase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato redutase (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (ROVER *et al.*, 2001) (fig. 2). O principal problema da formação da espécie reativa peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é o fato de este atravessar com facilidade as membranas biológicas e ao receber mais um elétron proveniente do ferro ou do cobre (reação de Fenton) originar o radical hidroxila, o qual é o mais reativo entre as espécies radicalares conhecidas.

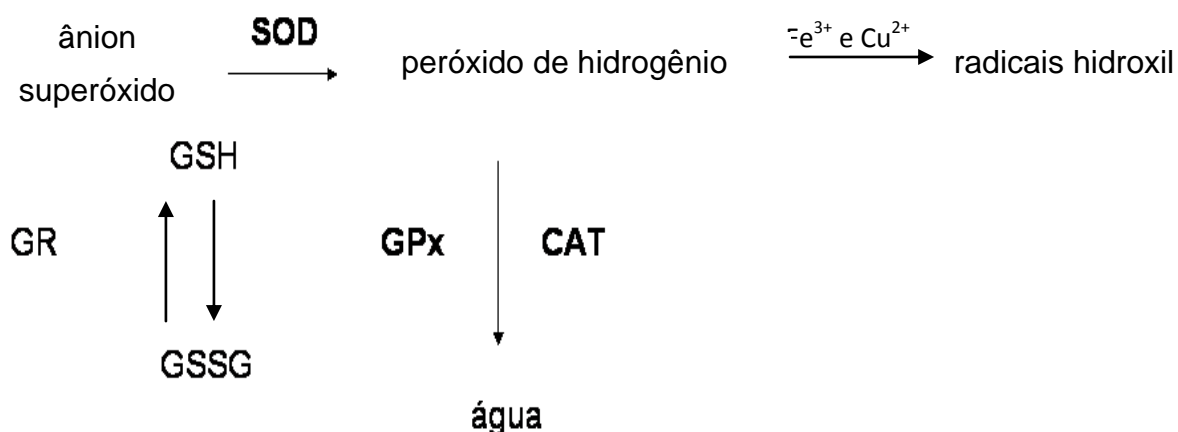


Figura 2: Sistemas antioxidantes enzimáticos e radical hidroxila sendo gerado via reação de fenton; SOD: superóxido dismutase, GR: glutathiona redutase, GSH: glutathiona reduzida, GSSG: glutathiona dissulfeto, GPx: glutathiona peroxidase, CAT; catalase.

1.5.3 Danos às biomoléculas

Sob estresse oxidativo o ambiente celular se torna mais reativo, podendo causar danos às estruturas celulares, inativações enzimáticas, carbonilação de proteínas (PCO), peroxidação lipídica (LPO), danos de DNA, e até morte celular (VANCINI *et al.*, 2008), os quais podem ser utilizados como biomarcadores.

A lipoperoxidação, que é a oxidação dos ácidos graxos insaturados de membrana mediada por radicais livres, é um potencial biomarcador de contaminação ambiental (STEGEMAN *et al.*, 1992; HAI *et al.*, 1995), através dela podemos inferir sobre os danos causados as células pelo estresse oxidativo (KAPPUS, 1987).

O processo de peroxidação lipídica ocorre por uma reação em cadeia, e demonstra a habilidade de uma única espécie radicalar em propagar reações bioquímicas deletérias (VAN DER OOST *et al.*, 2002). Quando um radical livre qualquer interage com um ácido graxo insaturado da membrana celular, ocorre o sequestro um átomo de hidrogênio resultando na formação de um radical lipídico, este reage com O₂, abundante nas regiões de membrana, gerando um radical peroxila, que por sua vez irá sequestrar um átomo de hidrogênio de um novo ácido graxo formando hidroperóxido e um novo radical lipídico que dará continuidade a reação em cadeia (Figura 3).

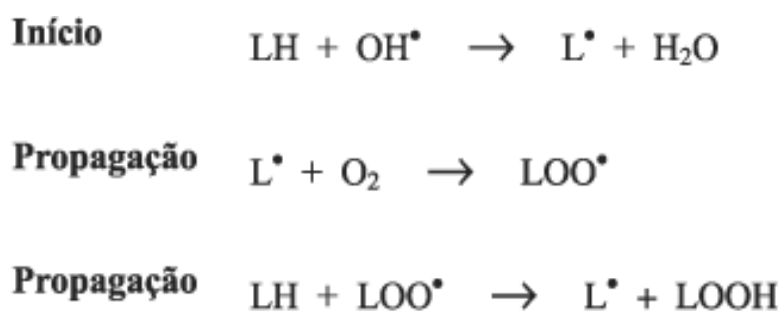


Figura 3 - Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação (LH: ácido graxo insaturado; OH[•]: radical livre; L[•] : radical lipídico, LOO[•] : Radical peroxila e LOOH: hidroperóxido lipídico. Fonte: GUARATINI *et al.*, 2007.

As consequências mais comuns da LPO correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas, incluindo o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e a preservação do gradiente de íons e metabólitos (REBELLO, 2009).

Proteínas podem ser carboniladas durante processo de estresse oxidativo. A carbonilação consiste na modificação de cadeias laterais de aminoácidos, com a formação de grupamentos aldeídicos, cetônicos (C=O), entre outros (FILIPAK NETO, 2005). A detecção de níveis aumentados ou reduzidos de carbonilas em proteínas (PCO) é sinal não apenas de estresse oxidativo, mas também de disfunção proteica (DALLEDONNE *et al.*, 2003). Proteínas sabidamente sensíveis a carbonilação incluem enzimas envolvidas no metabolismo energético como a aconitase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, piruvato desidrogenase, 2-oxoglutarato desidrogenase e ácido graxo sintase, além da Hsp60p e Cu, Zn-SOD (AGUILANIU *et al.*, 2001), sendo a última, como descrita anteriormente, uma importante enzima envolvida na defesa celular contra EROs.

1.5.4 Metalotioneínas

O estresse ambiental, bem como condições fisiológicas variadas, podem induzir a síntese de certas proteínas nos peixes. Acredita-se que algumas destas tenham papel na proteção celular contra o dano causado por perturbações ambientais, entre estas estão as metalotioneínas (MTs) (VAN DER OOST *et al.*, 2002).

As metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína que atuam no controle de metais essenciais como Cu e Zn, e na destoxificação destes e outros não essenciais como o Cd e o Hg (ROESIJADI e ROBINSON, 1994), protegendo a célula de danos irreversíveis causados por interação com estes metais. O papel das MTs como sequestradoras de metais, bem como a sua indução por exposição a uma ampla variedade de metais (ex. Cd, Cu, Zn, Hg, Co, Ni, Bi, e

Ag) é bem conhecido e está relacionado com sua função protetora (STEGEMAN *et al.*, 1992; VIARENGO *et al.*, 2000), o que as torna importantes biomarcadores da exposição a metais.

1.5.5 Delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALAd)

A delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALAd), também conhecida como porfobilinogênio sintase ou aminolevulinato hidrolase, exerce um papel crucial na vida biológica da célula eucariótica, por fazer parte da rota de síntese do grupo HEME. Este é o grupo prostético da metaloenzima hemoglobina, que faz o transporte de oxigênio no sangue. O HEME está envolvido com a atração de elétrons pelas cargas positivas do metal ferro, átomo que muda do estado férrico (Fe^{+3}) para o estado ferroso (Fe^{+2}), quando esse recebe um elétron. Proteínas que têm o grupo HEME em sua estrutura (hemoproteínas) operam de diversas formas na célula eucariótica: catalases, complexo citocromo oxidase P450 e outros citocromos.

A δ -ALAd pode ser encontrada na maioria das bactérias aeróbicas e em plantas e animais. A atividade catalítica da δ -ALAd permite a transformação química de duas moléculas de aminolevulinato (ALA) em um dos quatro anéis pirrólicos constituintes do grupo HEME, o porfobilinogênio (PBG), neste processo ocorre uma condensação aldólica e uma ciclização, com eliminação de duas moléculas de água (ALVES COSTA, 2006). A δ -ALAd é inibida na presença de chumbo em diferentes tecidos, como o hepático (SECCHI, 1974).

1.5.6 Aminotransferases

Ambas as aminotransferases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), estão presentes no sangue em níveis baixos, porém quando há lesão hepatocelular seus níveis encontram-se elevados. A AST é encontrada, em ordem decrescente quanto à concentração, no fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e

eritrócitos. Os níveis mais elevados de ALT são encontrados no fígado, podendo ser considerado marcador específico de dano hepático. Vale salientar, contudo, que há pouca correlação entre a intensidade de dano hepático e níveis de transaminases (PRATT e KAPLAN, 1999). São responsáveis por catalisar a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o α -cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico, tais reações requerem piridoxal fosfato como coenzima. As reações catalisadas pelas aminotransferases (transaminases) exercem papéis centrais tanto na síntese como na degradação de aminoácidos. Além disso, como estas reações envolvem a interconversão dos aminoácidos a piruvato ou ácidos dicarboxílicos, atuam como uma ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos (MOTTA, 2003).

A liberação destas enzimas para o plasma é consequência de: lesão celular extensa, proliferação celular e aumento na renovação celular, aumento na síntese enzimática e/ou obstrução de ductos. A utilidade como biomarcador da medida das aminotransferases plasmáticas reside no fato que as alterações em suas atividades fornecem indicadores de lesão ou proliferação celular do tecido hepático (MOTTA, 2003).

1.5.7 Neurotransmissores

A comunicação neuronal resulta na percepção sensorial, codificação de informações e planejamento de ações. Estes processos são maciçamente dependentes da ativação e inibição de células ao longo de diferentes vias por diversos neurotransmissores. Sabe-se que as informações são mantidas no sistema nervoso central (SNC) pelo reforço das sinapses em projeções neuronais, e que sua codificação é dependente de como estes neurônios disparam ao longo do tempo. Estas projeções formam uma gigantesca rede, o que permite a ocorrência de associações (MOREIRA, 2001). De modo que alterações nos níveis de neurotransmissores, podem ter importantes implicações em diferentes sistemas, desde hormonais, motores, etc, até comportamentos indispensáveis à sobrevivência e perpetuação da espécie, como os comportamentos de fuga do predador e de corte.

Com relação a essas funções neurais, foram dosados neste estudo três neurotransmissores: serotonina (5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (DA) no cérebro de *H. malabaricus*. Dada a importância fisiológica de neurotransmissores como moléculas de sinalização do sistema nervoso, a mensuração destes tem um potencial significativo como uma ferramenta na avaliação ecotoxicológica.

1.5.8 Histopatologia

O fígado de teleósteos, de maneira geral, é formado por células do parênquima hepático (com forma oval até polígonos irregulares) que se encontram dispostas de forma concêntrica ao redor de capilares sanguíneos, os sinusóides. Seus núcleos são geralmente esféricos. Há regiões especializadas de membranas, com dois a quatro hepatócitos, que formam canalículos biliares que são canais intercelulares que recebem a bile por secreção celular. Vários canalículos formam o ducto biliar. Esses ductos convergem, por sua vez, para um ducto hepático que pode se abrir no duodeno ou alimentar a vesícula biliar, dependendo da espécie de peixe (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; DREYER, 2008). Através da microscopia de luz é possível avaliar efeitos de xenobiótico em órgãos e tecidos alvos. Segundo Fent (1996), os efeitos nas estruturas das células e tecidos constituem um importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos.

O órgão analisado através de histopatologia neste trabalho foi o fígado. Por ser o principal órgão responsável pela biotransformação e/ou bioativação de compostos endógenos e xenobiótico, representa um excelente alvo para estudos de danos resultantes da exposição a diferentes contaminantes (RABITTO *et al.*, 2005).

1.6 ESCOLHA DAS DOSES

O ambiente aquático está sujeito a inúmeras perturbações e a biota reage a esses estímulos, sejam eles naturais ou antropogênicos. A habilidade de proteger os ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais (CAIRNS, 1993), desta forma estudos em laboratório que

mimetizem a situação real na qual os diferentes ecossistemas se encontram, são de suma importância para o entendimento das mesmas.

Dentro desta ótica, buscamos nos aproximar da nossa realidade utilizando a espécie nativa *H. malabaricus*, e dados da literatura sobre concentrações de Pb em peixes do ambiente. Desta forma estabelecemos a dose intermediária de Pb (1,0 mg/kg por dose) a qual está dentro da variação encontrada na literatura (0,21 - 6,5 mg/kg de peixe). As outras duas foram baseadas nesta mesma, sendo uma 10 vezes menor (0,1 mg/kg por dose) e outra 10 vezes maior (10 mg/kg por dose) (TÜRKMEN *et al.*, 2008; ABDALLAH, 2008; LIMA JÚNIOR *et al.*, 2002).

Uma vez que, existem poucos dados sobre a presença e concentrações da nano TiO₂ no ambiente, para nosso trabalho nos baseamos nas predições do artigo “Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of *in vivo* data (MENARD *et al.*, 2011), segundo o mesmo estas devem estar presentes em águas na ordem de 0,7-16 µg/l. Sendo assim adotamos um valor médio de 15 µg/l corrigido por um fator de bioacumulação de 10 vezes, com o intuito de inferir sobre o acúmulo desta nos organismos, resultando então na dose de 150 µg/kg por dose.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis efeitos do chumbo, bem como os interativos da co-exposição por via trófica à nanopartícula TiO_2 e Pb, sobre diferentes biomarcadores em *Hoplias malabaricus*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar os efeitos das exposições isoladas e associadas sobre a função hepática através dos marcadores:
 - I. de avaliação do ambiente redox celular: concentração de glutathiona reduzida (GSH), atividade da glutathiona peroxidase (GPx), atividade da glutathiona redutase (GR), atividade da catalase (CAT), atividade da superóxido dismutase (SOD) e glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH);
 - II. de metabolismo, através da atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST);
 - III. de danos causados às biomoléculas, proteínas (carbonilação - PCO), e lipídios (lipoperoxidação - LPO), bem como alterações sobre as metalotioneínas e a desidratase do ácido - aminolevulínico (δ -ALAD);
 - IV. de danos no tecido através da atividade das transaminases aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT),
 - V. histologia hepática através do índice de Bernet,
 - VI. detectar a presença de metais o fígado através de autometalografia;
- Avaliar os efeitos das exposições isoladas e associadas sobre a bioacúmulo de Pb no tecido muscular dos peixes expostos através de espectrometria de emissão óptica;
- Avaliar os efeitos das exposições isoladas e associadas sobre parâmetros neurais através da dosagem dos neurotransmissores serotonina (5-HT), dopamina (DA), noradrenalina (NA) no tecido cerebral através de cromatografia líquida;

- Gerar dados que possam auxiliar na discussão sobre os efeitos de misturas de poluentes em organismos nativos, de forma a contribuir para a discussão sobre os níveis máximos permissíveis presentes na legislação brasileira.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os peixes foram obtidos em uma piscicultura localizada no município de Garuva-SC, transportados em sacos plásticos com aeração adequada até o Laboratório de Toxicologia Ambiental do departamento de Farmacologia da UFPR, onde foram aclimatados durante aproximadamente 4 semanas, com temperatura em torno de 25⁰ C, aeração constante, ciclo claro/escuro de 12 horas. Juvenis de carpa (*Cyprinus carpio* - 8–15 g) foram oferecidos como alimento 2 vezes por semana (durante o período de aclimação). Após o referido período, os 64 indivíduos, pesando entre 300-500g, foram distribuídos em 8 grupos, como segue descrito na tabela a baixo:

Tabela 1: disposição dos indivíduos nos grupos experimentais.

Grupos / experimento <u>Trófico</u> (1 dose / 5dias – por 70 dias)	
Controle	Água
PbI	0,1 mg/kg Pb
PbII	1,0 mg/kg Pb
PbIII	10 mg/kg Pb
TiO₂	150 µg/kg
PbI + TiO₂	0,1 mg/kg Pb e 150µg/L de TiO₂
PbII + TiO₂	1,0 mg/kg Pb e 150µg/L de TiO₂
PbIII + TiO₂	10 mg/kg Pb e 150µg/L de TiO₂

Optamos por usar o sistema de force *feeding*, este sistema já foi usado por outros pesquisadores (Mela *et al.*, 2012) e ainda também testado por nosso grupo em um experimento piloto, no qual peixes controles foram submetidos ao mesmo, sem contudo aparentar sinais clínicos de toxicidade.

Neste caso, a cada 5 dias, cada animal foi retirado de seu aquário e anestesiado em água contendo benzocaína alcoólica 10% (final 1% em água), o

animal foi considerado anestesiado quando permaneceu em decúbito dorsal (Figura 4).



Figura 4: *H. malabaricus* em processo de anestesia, benzocaína alcoólica 1%.

Em seguida foi pesado para ajuste da dose, e então com o auxílio de uma cânula de gavagem para ratos (Figura 5), a solução correspondente ao seu grupo foi administrada através de gavagem (Figura 6). Logo após este procedimento o alimento foi depositado no interior de seu estômago com o auxílio de uma pinça cirúrgica de ponta romba (Figura 7). Ao final do procedimento o peixe foi reintroduzido em seu aquário, na grande maioria das vezes já se recuperando da anestesia.



Figura 5: Sonda de gavagem para ratos, utilizada para gavagem nos peixes.



Figura 6: *H. malabaricus* anestesiado, recebendo gavagem.



Figura 7: *H. malabaricus* anestesiado, recebendo alimento.

Após os 70 dias de exposição, esperamos 3 dias (para que a última dose fosse absorvida) e então após o animal anestesiado, cerca de 1,5 ml de sangue foi coletado da veia caudal com seringa heparinizada, centrifugado e posteriormente o plasma foi armazenado para dosagem das aminotransferases. Após a coleta do sangue, cada indivíduo foi pesado e sacrificado por secção medular. Um fragmento do fígado foi armazenado em freezer -80°C para análise dos marcadores de *status*

oxidativo, danos às biomoléculas, e delta aminolevulinato desidratase (δ -ALAd), e outro fragmento foi fixado para histologia e autometalografia. O cérebro e uma porção de músculo foram coletados, e armazenados em freezer -80° para dosagem dos neurotransmissores e do conteúdo de Pb respectivamente, detalhes da metodologia estão descritos nos artigos (páginas 39-43, 62-64).

ARTIGO I

Artigo enviado para publicação

Interactive effects of titanium dioxide nanoparticles and lead in oxidative parameters of the freshwater fish *Hoplias malabaricus*

Abstract.

When bulk materials are converted to nanoscale, their surface chemistry changes and chemical reactivity increases, and this can lead to an increased capacity to adsorb components on their surface. The present study investigated interactive effects of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in variable lead (Pb) concentration in *Hoplias malabaricus* trophically exposed, through biomarkers of oxidative stress and stress proteins. The presence of TiO₂ did not affect the antioxidant system; only the catalase (CAT) activity increased. Lead alone, mainly at the highest doses tested caused oxidative stress and inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALAd) activity. The results suggested that the co-exposure of TiO₂ and Pb had some effects than those to Pb alone. The interaction might have avoided the increase of some antioxidant enzymes and δ -ALAd inhibition; only protein carbonylation (PCO) and glutathione reductase (GR) increased in the co-exposed groups compared to control groups. The trophic experiment used in this study was not able to explain an action mechanism for the interaction, but it was observed in some biomarkers an interactive effect between the both xenobiotics. It is possible that the interaction of Pb and nano-TiO₂ decrease the Pb bioavailability for interacting with cellular components, possibly by adsorption. Therefore, further studies should be carried out to study this action mechanism.

Keywords: *Hoplias malabaricus*, oxidative stress, nanoparticles, metals, trophic exposure.

1. Introduction

The potential of nanoparticles (NPs) to react with biological systems has been recognized in recent years and a number of (eco) toxicity studies of these emerging pollutants have appeared (Menard et al., 2011).

When bulk materials are made into nanoscale, their surface-to-volume ratio and chemical reactivity increase considerably. So, as soon as particles come into contact with liquid or gaseous heterogeneous environments, smaller structures, such as atoms, atom clusters, single molecules, and macromolecules attach to the surface of the particle, binding with different degrees of strength (Elsaesser and Howard, 2012). This way, the nanoparticles may carry adsorbed compounds, such as metals, into the cells by endocytosis.

Nano-sized titanium dioxide (TiO_2) is utilized in a variety of consumer products, such as sunscreens, cosmetics, paints, and surface coatings (Ghosh et al., 2010; Hu et al., 2011), as well as observed in the environmental decontamination of air, soil, and water, including Pb contamination (Recillas et. al., 2011; Yu et al., 2012). With its large production and growing applications, nanoparticle TiO_2 is rapidly entering the aquatic environment, and thus presents increasing risks due to the still little knowledge ecotoxicological (Sharma, 2009).

Among the different classes of contaminants, metals are a particular environmental problem due to their persistence, long-range transport, and potential to bioconcentrate and bioaccumulate up to high levels in aquatic organisms (Franco-Uría et al., 2010). Metals are natural constituents of the environment, being present at different concentrations across geographic regions. Unlike several organic

pollutants, which can be degraded to less harmful components by biological and chemical processes, metals are considered non degradable pollutants (Pan and Wang, 2012). Lead (Pb) is the most abundant heavy metal in the earth's crust. It has been used since prehistoric times, and has become widely distributed and mobilized in the aquatic environment, leading to increased exposure (Tong et al., 2000).

As briefly established, Pb and nano-TiO₂ are potential environmental contaminants that may interact in aquatic environments, and so, data about simultaneous exposure are essential to establish the risks to biota including via chain food. The majority of the knowledge about metals, as well as nanoparticles toxicity, relates to sublethal effects of high concentrations, but the toxicity to fish at environmentally relevant concentrations are still poorly understood. For this reason, the present study focused on the investigation of the toxic effects of concentrations of Pb found in the environmet (Lima Júnior et al., 2002; Abdallah, 2008; Türkmen et al., 2008) and TiO₂ nanoparticles (Menard et al., 2011).

An organism has two major ways of eliminating a chemical, it is either excreted in its original form (the parent compound) or it is biotransformed by the organism. The organ most commonly involved in the biotransformation of foreign compounds is the liver, because of its function, position, and blood supply (Van der Oost et al., 2003). Metals such as Pb and nano TiO₂ are not metabolized by the biotransformation pathways that normally act on organic molecules, but their concentrations are modulated by scavengers, such as metallothioneins, albumin, and other plasma protein, as well as by GSH and other small thiols. So, when metals are free or present in excess, their electrophilic character may lead to interactions with SH groups of proteins, affecting their function and deregulating important processes, such as metabolism, immune function, and oxidative stress parameters.

In this study, *Hoplias malabaricus* was trophically exposed to evaluate the possible modulatory effects of nano TiO₂ on the Pb toxicity. The hypothesis is that the nanoparticles increase the metal uptake. This freshwater predator teleost is widely distributed in South America (Fowler, 1950), and occupies a high trophic level in the aquatic food chain, thus serving as a valuable biological model of fish for tropical Brazilian ecosystems.

2. Materials and methods

2.1 Fish

Specimens of *Hoplias malabaricus* (300–500 g) were obtained from a commercial fish farm (Garuva City, Santa Catarina State, Brazil) and maintained collectively in 200 L water tanks with dechlorinated tap water for 4 weeks before the experiments. Fish were kept at constant aeration, a temperature of 25°C and a photoperiod of 12h, and fed every 5 days.

2.2 Pollutants and preparation of solutions

TiO₂ nanoparticles with average sizes of 21 nm and surface area of 35-65 m²/g (Sigma-Aldrich®), and lead(II) acetate 99.95% purity ((CH₃COO)₂Pb - Alfa Aesar®) were used in this work. Both pollutants were prepared in distilled water, the solutions/suspensions were mixed with a sonicator probe (10 cycles of 2min), for dissolving possible aggregates of nano TiO₂.

2.3 Experimental design

A number of 64 fish were randomly distributed into eight experimental groups, and kept in aquaria of 100L. Fish were exposed to either Pb (0.1, 1 and 10 mg kg⁻¹ per day), nano TiO₂ (150 µg kg⁻¹ per dose) or the mixture of both; one control group (H₂O) was maintained in parallel. Exposure was performed through gavage with a the solution/suspension of Pb, nano TiO₂ or both (mixture) every 5 days and the contaminant volume was adjusted according to predator biomass.

The dose 1 mg. kg⁻¹ of Pb was based in the measurements of this metal in fish liver from literature and, one 10-fold lower (0.1 mg.kg⁻¹ per dose) and one 10-fold higher (10 mg.kg⁻¹ per dose) dose were established (Türkmen et al., 2008; Abdallah, 2008; Lima júnior et al., 2002). The dose of nano TiO₂ was established applying a bioaccumulation constant of ten times on the values predicts for the nano TiO₂ in water, since no values had found in aquatic organisms (Menard et al., 2011).

At the end of 70-day exposure (14 individual doses), fish were anesthetized with benzocaine (200 ppm in water), weighted and killed through medullar section, and the livers were sampled and frozen at -80°C for subsequent biochemical analyses. All the procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Canadian Council on Animal Care). This experimental design was adapted from the method previously used and published by our group (Rabitto et al., 2005; Alves Costa et al., 2007; Silva et al., 2011).

2.4 Sample preparation and biochemical biomarkers

The liver samples were thawed on ice, homogenized in sodium-phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4°C and the supernatant was stored at –80°C. The supernatants were used to measure the activities of the enzymes and the concentrations of glutathione was measured (GSH), lipid peroxidation (LPO), and products of protein carbonylation (PCO).

Catalase activity was assayed by the decrease in absorbance at 240 nm due to H₂O₂ consumption (Aebi, 1974). Glutathione-S-transferase (GST) activity was measured according to Keen et al. (1976) at 340 nm using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured at 340 nm (Sies et al., 1979), and the GSH concentration was measured at 415 nm (Sedlak and Lindsay, 1968). The activity of superoxide dismutase (SOD) was assayed by measuring its ability to inhibit the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT), which was determined by the method described by Crouch et al. (1981). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity was measured at 340 nm for 3 min and NADPH molar extinction coefficient of 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹ was utilized for enzyme activity calculation (Glock and Mclean, 1953). Metallothioneins were determined based on the method described by Viarengo et al. (1997). The levels of MT-SH were calculated by assuming the relationship, 1 mol MT-SH = 20 moles of GSH. The analysis of LPO was carried out using the ferrous oxidation–xylenol orange assay at 570 nm (Jiang et al., 1992); PCO analysis was conducted at 360 nm by derivatization of the protein carbonyl groups with 2,4-dinitrophenol hydrazine to yield dinitrophenyl hydrazones (Levine et al., 1994). The glutathione disulfide reductase (GR) activity was determined based on the method described by Sies et al. (1979) with some modification: 50 µl of the supernatant or phosphate-buffered saline (blank) and reaction medium (170 µl, 0.5 mM β-NADPH, 5.0 mM glutathione disulfide (GSSG), 5.0 mM EDTA, 0.1 M

potassium phosphate buffer, pH 7.6, and 25 °C) were mixed in a 96-well microplate. The absorbances were measured at 340 nm for 10 min.

The delta-aminolevulinicacid dehydratase (δ -ALAd) activity was measured according to Sassa (1982), with modifications. The liver supernatants (100 μ l) were mixed with 500 μ l of 4.0 mM δ -aminolevulinic acid hydrochloride, 0.5% Triton X-100 in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3) and incubated at 25°C for 2 h. The reaction was stopped with 400 μ l of 4% trichloroacetic acid, 99.45 mM HgCl₂, and an ice-bath. For blanks, the reaction was stopped before incubation for 2 h. The tubes were centrifuged at 5000 *g* for 5 min at 4°C. The supernatant (125 μ l) and 125 μ l Ehrlich reagent solution were placed in a 96-well microplate. After 15 min, the absorbances were measured at 570 nm. The enzymatic activity was calculated by comparison with the porphobilinogen standard curve.

The protein concentration was measured according to Bradford's method (1976), with bovine serum albumin (BSA) as the standard, and used to adjust the biomarkers values per mg of protein.

2.5 Statistical procedures

Nonparametric test Kruskal-Wallis test and Dunn's test were performed for the biomarkers analysis. The results are expressed as medians and interquartile ranges. The exposed groups were compared to the control group. The nanoTiO₂ group was also compared with the TiO₂ + Pb groups and the Pb group with their respective mixture group, TiO₂ + Pb. $P < 0.05$ was assumed as statistically significant.

2 Results and Discussion

No mortality, signs of mobility changes and skin lesions were observed in the control and experimental groups throughout the experiment. In this study, SOD activity was not changed in all the groups (Table 1).

Likewise, Ferreira et al. (2008) did not find any correlation between the Pb concentration and SOD activity in white seabream (*Diplodus sargus*) from the Northwest Atlantic region. However, CAT activity increased in the 10 mg.kg⁻¹ (Pb2) and 10 mg.kg⁻¹ (Pb3) of Pb and TiO₂ isolated groups and in the co-exposed group related to control group (TiO₂ + Pb1). In the others co-exposed groups no interactions statistically significant between Pb and nano TiO₂ were observed. Therefore, the activities were not different of control group, suggesting a decreasing of effect observed with lead and nanoparticle isolated. SOD and CAT activities are considered the first-line of the enzymatic antioxidant defense system, with SOD producing hydrogen peroxide from superoxide and CAT eliminating it. Both enzymes are affected in juvenile *Cyprinus carpio* by TiO₂ exposure, but at higher exposure levels (100–200 mg/L) (Linhua et al.,2009). Atli and Canli (2007) exposed *Oreochromis niloticus* to 5 and 20 µM of Pb, and the liver catalase (CAT) activity was also induced. Besides CAT, GPx is involved in hydrogen peroxide metabolism, but this enzyme was not affected by Pb and TiO₂ exposure in the present study. CAT is particularly abundant in peroxisomes, whereas GPx is more ubiquitously distributed inside the cells. Thus, peroxisomal pathway of reactive oxygen species (ROS) production may play a role in Pb and TiO₂ toxicity.

Table 1: Activity of antioxidant enzymes in the liver of *H. malabaricus*.

<i>Parameter evaluated</i>	<i>Experimental groups</i>							
	Control (n=7)	Pb1 (n=4)	Pb2 (n=6)	Pb3 (n=8)	TiO₂ (n=6)	TiO₂+Pb1 (n=7)	TiO₂+Pb2 (n=6)	TiO₂+Pb3 (n=7)
SOD (U.mg prot ⁻¹)	7.0 (5.3-7.7)	7,6 (4.3-9.9)	7,6 (4.2-8.2)	4,5 (2.8-5.7)	2.4 (1.7-5.6)	8.0 (5.9-8.6)	8.8 (5.1-11.5)	6.9 (5.2-10.0)
CAT (nmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	0.46 (0.40-0.49)	0.50 (0.39-0.63)	0.62* (0.61-0.76)	0.65* (0.54-0.70)	0.63* (0.52-0.70)	0.57* (0.53-0.81)	0.57 (0.54-0.60)	0.61 (0.53-0.70)
GR (μmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	0.67 (0.53-0.80)	0.68 (0.59-0.75)	0.84 (0.74-0.89)	0.77 (0.50-0.91)	0.78 (0.70-0.84)	0.80 (0.70-0.92)	0.74 (0.71-0.82)	0.87* (0.77-0.92)
GPx (μmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	0.28 (0.26-0.30)	0.29 (0.27-0.38)	0.29 (0.27-0.33)	0.28 (0.26-0.31)	0.30 (0.25-0.30)	0.33 (0.24-0.38)	0.33 (0.23-0.36)	0.30 (0.25-0.33)
GSH (nm.mg prot ⁻¹)	2.84 (0.27-0.38)	4.87 (3.14-6.59)	6.08* (6.05-7.90)	9.90* (6.82-10.33)	4.65 ^a (2.67-5.90)	4.52 (4.29-4.72)	5.15 (3.74-6.63)	7,72 ^{b*} (7.42-9.30)
G6PDH (mmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	0.014 (0.01-0.02)	0.02 (0.02-0.03)	0.03 (0.02-0.05)	0.05* (0.03-0.05)	0.03 (0.01-0.05)	0.03 (0.02-0.06)	0.04 (0.02-0.06)	0.04 (0.02-0.05)
GST (mmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	7.09 (7.30-8.21)	11.31 (7.30-15.59)	21.09 (13.55-28.97)	33.54 ^{*a} (25.40-41.72)	10.65 (5.23-17.17)	15.29 (10.0-18.83)	17.68 (12.55-22.01)	18.04 ^{*b} (15.58-27.27)

Table 1: Asterisks (*) indicate difference between exposed groups and control; letters indicate differences between TiO₂+Pb, Pb and TiO₂. Experimental groups: control, TiO₂ (150 μg.kg⁻¹), TiO₂ (150 μg.kg⁻¹) + Pb1 (0,1 mg.kg⁻¹), TiO₂ (150 μg.kg⁻¹)+Pb2 (1.0 mg.kg⁻¹), TiO₂ (150 μg.kg⁻¹)+Pb3 (10 mg.kg⁻¹), Pb1 (0.1 mg.kg⁻¹), Pb2 (1.0 mg.kg⁻¹), Pb3 (10 mg.kg⁻¹). Kruskal-Wallis, Dunns, median with interquartile range.

The GSH concentration increased after exposure to 1 mg.kg⁻¹ (Pb2) of lead (104%), 10 mg.kg⁻¹ (Pb3) of lead (204%) and in the co-exposed group TiO₂+Pb3 (165%) compared to control group. However, no interaction between Pb and TiO₂ was observed. An increase of GSH, followed by normalization, was observed in *Oreochromis niloticus* exposed for 7 and 14 days to Pb (Atli et al., 2010). The GSH levels did not return to control levels even at a longer exposure period (70 days) in *H. malabaricus* for Pb2, Pb3 and TiO₂+Pb3. And despite the absence of statistical differences between Pb2 + TiO₂ and Pb2, the Pb2 group differed compared to control. These results indicated a tendency for less toxicity in the co-exposed group. It can be due to an adsorption action of nano TiO₂, decreasing the Pb disponibility.

GR activity increased only in TiO₂+Pb3 (31%) compared to control group. This enzyme is responsible for restoring the levels of GSH, which is considered the first-line non-enzymatic antioxidant defense system, acting as a radical scavenger, antioxidant, and cofactor for GPx and GST (Commandeur *et al.*, 1995). Since we observed no change in GPx activity, we assume that the increased activity of GSH restorer must have been induced by increased demand for GSH by GST.

An increase of G6PDH activity of the 10 mg.kg⁻¹ (Pb3) group means an increment of pentose-phosphate pathway and NADPH production (Carvalho and Fernandes, 2008). NADPH is a radical scavenger and cofactor for GR, important for GSH maintenance. A similar increase in G6PDH activity under stress was previously reported (Stephensen et al. 2000; Pandey et al., 2003; Rosety-Rodriguez et al., 2005; Alaa et al., 2007).

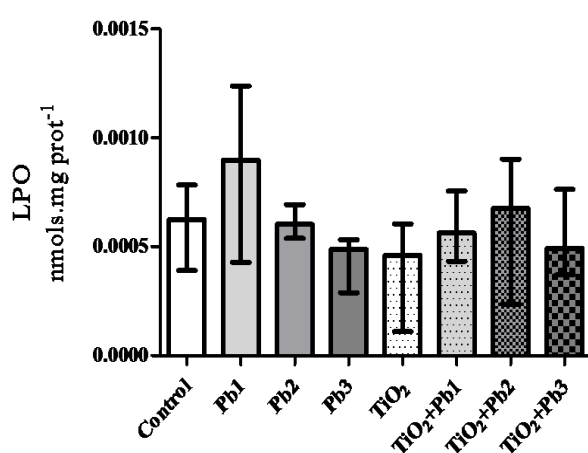
Glutathione S-transferase (GST) plays a role in detoxification, being crucial for the determination of the sensitivity of cells to various toxic chemicals, including environmental pollutants and products of oxidative stress (Woo et al., 2009). In this

work, GST activity increased in the groups 1 (Pb2) and 10 mg.kg⁻¹ (Pb3) of lead and the TiO₂ nanoparticle was able to decrease the GST activity compared to Pb3 group. The GST activity in the Pb3 group was 53% higher than TiO₂+Pb3. The increased GST activity has been reported for both xenobiotics (Maity et al., 2008; Klaper et al., 2009; Kim et al., 2010). An interactive effect between Pb and TiO₂ was observed for this biomarker.

When the antioxidant defenses are ineffective against the reactive oxygen species (ROS), the biomolecules may be damaged. Protein carbonylation (PCO) increased in the Pb3 group (41%), TiO₂+Pb2 (53%), and TiO₂+Pb3 (69%) related to control (Figure 1B). Therefore, no differences were observed in the co-exposed groups compared to isolated Pb groups. The lipoperoxidation was also not different among the groups (Figure 1A).

Figure 1

A



B

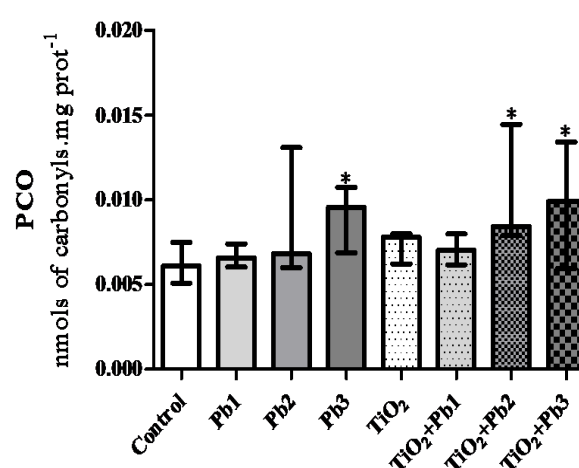


Figure 1: (A) Lipid peroxidation (LPO) in nanomoles per mg of protein in liver. **(B)** Protein carbonylation (PCO) in nanomoles of carbonyls produced per mg of protein in liver. The bars are median with interquartile range. Asterisks (*) indicate difference between exposed groups and control. Experimental groups: control, TiO₂ (150 µg.kg⁻¹), TiO₂ (150 µg.kg⁻¹) + Pb 1 (0,1 mg.kg⁻¹), TiO₂ (150 µg.kg⁻¹) + Pb 2 (1,0 mg.kg⁻¹), TiO₂ (150 µg.kg⁻¹) + Pb 3 (10 mg.kg⁻¹), Pb 1 (0,1 mg.kg⁻¹), Pb 2 (1,0 mg.kg⁻¹), Pb 3 (10 mg.kg⁻¹), $p < 0.05$ Kruskal-Wallis, Dunns.

The Pb inhibited (54%) the δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALAd) in the Pb3 group (Figure 2) and nano TiO_2 apparently interacted in such inhibition, once the group TiO_2 +Pb3 was not inhibited. δ -ALAd is essential to heme synthesis and has an indirect antioxidant role through the reduction of free substrate aminolevulinic acid (ALA). ALA accumulation promotes the release of reactive oxygen species from ferritin, thereby contributing to oxidative stress, and potentially hemolysis (Wood *et al.*, 2012).

Figure 2

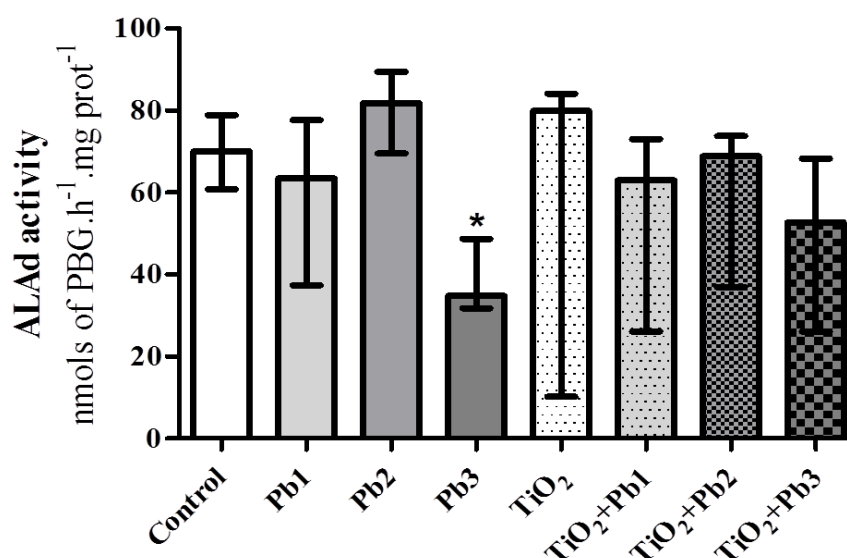


Figure 2: δ -ALAd activity in nanomoles of porphobilinogen produced per hour per mg of protein in liver. The bars are the median with interquartile range. Asterisks (*) indicate difference between exposed groups and control. Experimental groups: control, TiO_2 (150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), TiO_2 (150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) + Pb 1 (0,1 mg.kg^{-1}), TiO_2 (150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) + Pb 2 (1,0 mg.kg^{-1}), TiO_2 (150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) + Pb 3 (10 mg.kg^{-1}), Pb 1 (0,1 mg.kg^{-1}), Pb2 (1,0 mg.kg^{-1}), Pb3 (10 mg.kg^{-1}), $p < 0.05$ Kruskal-Wallis, Dunns.

The metallothionein (MT) is a low molecular weight, cysteine-rich protein that binds to heavy metals, acting in essential metal homeostasis and as a protective mechanism against heavy metal toxicity, such as Pb (Man and Woo, 2008). Pb and nano TiO_2 exposure did not affect MT concentration in comparison to the control group, but the interaction of TiO_2 with Pb seemed to decrease Pb bioavailability,

leading to lower MT concentrations in $\text{TiO}_2+\text{Pb1}$ when compared to the Pb1 group (Figure 3).

Figure 3

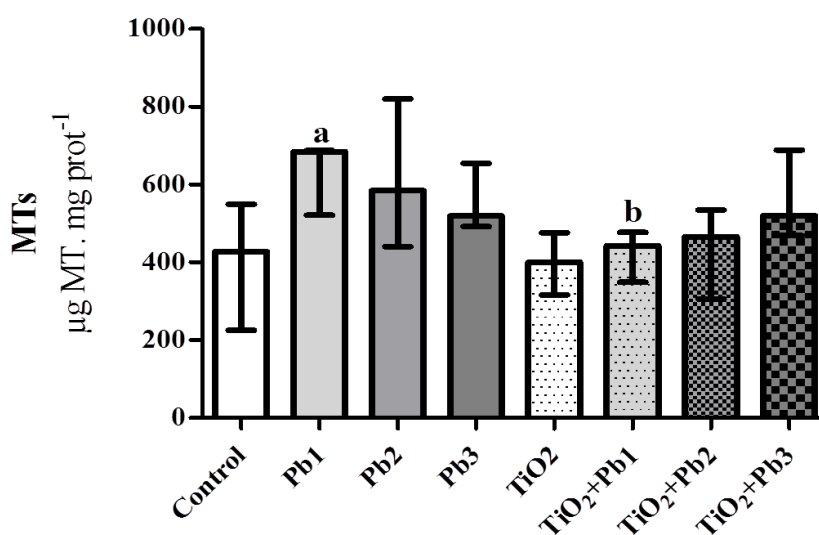


Figure 3: Metallothioneins (MTs) in micrograms of MTs produced per mg of protein in liver. The bars are the median with interquartile range. Letters indicate differences between $\text{TiO}_2 + \text{Pb}$, Pb and TiO_2 . Experimental groups: control, TiO_2 ($150 \mu\text{g.kg}^{-1}$), TiO_2 ($150 \mu\text{g.kg}^{-1}$) + Pb 1 (0.1 mg.kg^{-1}), TiO_2 ($150 \mu\text{g.kg}^{-1}$) + Pb 2 (1.0 mg.kg^{-1}), TiO_2 ($150 \mu\text{g.kg}^{-1}$) + Pb 3 (10 mg.kg^{-1}), Pb 1 (0.1 mg.kg^{-1}), Pb 2 (1.0 mg.kg^{-1}), Pb3 (10 mg.kg^{-1}), $p < 0.05$ Kruskal-Wallis, Dunns.

Different studies have reported the potential of metallic ions to adsorb on nanoparticles surface, which could increase the ion metallic concentration in cellular compartments if the resulting complex is able of being absorbed, by phagocytosis for example, and once inside the cell, the low pH of endosomes lead to release of this ions (Zhanget al., 2010). Therefore, the complex may be stable avoided the ion releases, or yet if the complex resulting is too big the absorption can be avoided, in both cases the Pb effect would be decreased. This last capacity has been cited may even make them useful for pollution remediation of aquatic environments (Jia et al., 2009; Recillas et al., 2011). The previously *in vitro* studies developing in our lab suggested that some concentrations of TiO_2 can protect the lead effect in cell culture. The trophic experiment used in this study was not able to explain an action

mechanism for the interactive effects of nanoparticles and lead. It is possible that some factors as the fish uptake and metabolism have been interfered in the effects, but it was possible to observed in some biomarkers an interactive effects between the both xenobiotics. Therefore, further studies should be carried out to study this action mechanism.

4. Conclusions

The exposure to lead alone caused oxidative damage to *H. malabaricus*, mainly at the highest doses. The tested dose of nano TiO₂ isolated through trophic exposure did not affect the biomarkers of stress oxidative and stress proteins, since only the catalase activity increased. The co-exposure of lead and TiO₂ nanoparticles suggested an interactive effect with cellular components, but the mechanism was not elucidated.

Acknowledgements. This research was supported in part by CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology).

References

- Abdallah, M. A. M., 2008. Trace element levels in some commercially valuable fish species from coastal waters of Mediterranean Sea, Egypt. J. Mar. Syst. 73, 114–122.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105, 121–126.

Alaa, G. M., Osman Imam, A., Mekkawy, J. V., Frank, K., 2007. Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Fish Physiol. Biochem.* 33, 1–13.

Alves Costa, J. R. M., Mela, M., Silva de Assis, H. C., Pelletierc, E., Randi, M. A. F., Oliveira Ribeiro C. A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82–88.

Atli, G., Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Bioch. Physiol., Part C.* 145, 282–287.

Atli, G., Canli, M., 2010. Response of antioxidant system of fresh water fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd,Cu,Cr,Zn,Fe) exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1884–1889.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Carvalho, C. S., Fernandes, M. N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism. *Comp. Biochem. Physiol., Part A.* 151, 437–442.

Commandeur, J.N.M., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P.E., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-

conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.* 47, 271–330.

Crouch, R.K., Gandy, S.E., Kimsey, G., Galbraith, R.A., Galbraith Buse, G.M., 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*. 30, 235–241.

Elsaesser, A., Howard, C. V., 2012. Toxicology of nanoparticles. *Adv. Drug Delivery Rev.* 64, 129–137.

Ferreira, M., Caetanob, M., Costa, J., Pousão-Ferreirac, P., Valeb, C., Reis-Henriquesa, M.A., 2008. Metal accumulation and oxidative stress responses in, cultured and wild, white seabream from Northwest Atlantic. *Sci. Total Environ.* 407, 638–646.

Fowler, H.W., 1950. Os peixes de água doce do Brasil. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*. 6, 205–404.

Franco-Uría, A., Otero-Muras, I., Balsa-Canta, E., Alonso, A.A., Roca, E., 2010. Generic parameterization for a pharmacokinetic model to predict Cd. *Chemosphere*. 79, 377–386.

Ghosh, M., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A., 2010. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere*. 81, 1253–1262.

Glock, G.E., Mclean, P., 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* 55, 400–408.

Hu, X., Chen, Q., Jiang, L., Yu, Z., Jiang, D., Yin, D., 2011. Combined effects of titanium dioxide and humic acid on the bioaccumulation of cadmium in Zebrafish. *Environ. Pollut.* 159, 1151–1158.

Jia, K., Pan, B., Lva, L., Zhang, Q., Wang, X., Pan, B., Zhang, W., 2009. Impregnating titanium phosphate nanoparticles onto a porous cation exchanger for enhanced lead removal from waters. *J. Colloid Interface Sci.* 331, 453–457.

Jiang, Z-Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1991. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem.* 202, 384–389.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W. B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione Stransferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.

Kim, K. T., Klaine, S. J., Cho, J., Kim, S. H., Kim, S. D., 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Sci. Total Environ.* 408, 2268–2272.

Klaper, R., Crago, J., Barr, J., Arndt, D., Setyowati, K., Chen, J., 2009. Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: changes in toxicity with functionalization. *Environ Pollut.* 157, 1152–1156.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 233, 346–357.

Lima Júnior, R.G.S. Araujo, F.G. Maia, M.F. Braz Pinto, A.S., 2002. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Res. A.* 89, 171-179.

Linhua, H., Zhenyu, W., Baoshan, X., 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci.* 21, 1459–1466.

Maity, S., Roy, S., Chaudhury, S., Bhattacharya, S., 2008. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environ. Pollut.* 151, 1–7.

Man, A. K. Y., Woo, N. Y. S., 2008. Upregulation of metallothionein and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in silver sea bream, *Sparus sarba* exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat. Toxicol.* 89, 214–221.

Menard, A., Drobne, D., Jemec, A., 2011. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environ Pollut.* 159, 677–684.

Pan, K., Wang, W. X., 2012. Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China. *Sci. Total Environ.* 422, 3–16.

Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish. *Sci. Total Environ.* 309, 105–115.

Recillas, S., García, A., González, E., Casals, E., Puentes, V., Sánchez, A., Font, X., 2011. Use of CeO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of lead from water toxicity of nanoparticles and derived compounds. *Desalination.* 277, 213–220.

Rosety-Rodriguez, M., Ordonez, F., Rosety, I., Rosety, J., Rosery, M. M., 2005. Erythrocyte antioxidant enzymes of gilthead as early-warning bio-indicators of oxidative stress induced by malathion. *Haema.* 8, 237–240.

Rabitto, I.S., Alves Costa, J.R.M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Akaishi, F.M., Anjos, Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Envir. Safety.* 60, 147–156

Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 28, 133–145.

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25, 192–205.

Sharma, V.K., 2009. Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment: a review. *J. Environ. Sci. Health A*. 44, 1485–1495.

Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Letters*. 103, 287–290.

Silva, C. A., Oba, E. T, Ramsdorf, W. A., Magalhães, V. F., Cestari, M. M., Oliveira Ribeiro, C. A., Silva de Assis, H. C., 2011. First report about saxitoxins in fresh water fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon*. 57, 141–147.

Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson, M., Forlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48, 431–442.

Tong, S., Schirnding, Y. E., Prapamontol, T., 2000. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull. World Health Organ.* 78, 1068–1077.

Türkmen, M., Türkmen, A., Tepe, Y., Töre, Y., Ates, A., 2008. Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas. *Food Chem.* 108, 794–800.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. A., 1997. Simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84.

Woo, S., Yum, S., Park, H., Lee, T., Ruy, J., 2009. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Japanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 149, 289–299.

Wood, C. M., Farrel, A. P., Brauner, C. J., 2012. Homeostasis and toxicology of non-essential metals. *Fish Physiol.* 31, 223.

Yu, Y., Wang, J., Parr, J.F., 2012. Preparation and properties of TiO₂/fumed silica composite photocatalytic materials. *Procedia Eng.* 27, 448–456.

Zhang, X., Lin, S., Lu, X.-Q., Chen, Z., 2010. Removal of Pb(II) from water using synthesized kaolin supported nanoscale zero-valent iron. *Chem. Eng. J.* 163, 243–248.

ARTIGO II

Artigo enviado para publicação

Modulatory Effect of nano TiO₂ on Pb in *Hoplias malabaricus* trophically exposed

Stéfani Cibeles Rossi, Maritana Mela, Suellen Lúcio Boschen, Claudio da Cunha, Francisco Filipak Neto, Ciro Alberto Oliveira Ribeiro, Helena Cristina Silva de Assis.

Abstract

The chemical interaction of lead (Pb) and nano TiO₂ may increase the Pb absorption, other hand may decrease Pb bioavailability for interacting with cellular components. The present study has investigated the hepatic and neural effects of different doses of TiO₂ nanoparticle and Pb contaminants in *Hoplias malabaricus* trophically exposed, through biochemical parameters as aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) activities, hepatosomatic index (HI), liver histopathology, autometallography, and neural transmission. The chemical analysis did not detect any muscle content of Pb, but autometallography revealed the presence of metals in the liver. The HI of exposed fish did not change compared to control group, but it was lower in the association TiO₂+Pb compared to TiO₂. The activity of ALT was higher in Pb and in co-exposed groups compared to the control group, but no interactive effect was observed. The AST activity was not altered by exposure to the contaminants. The decreased index observed in the highest dose of Pb plus TiO₂ group compared to TiO₂ may be related to increased energy demand corroborating with the related more pronounced toxic effects observed in this group. However, the alteration index was not different among individuals exposed to Pb but increased after TiO₂+Pb groups in comparison to control group. Serotonin concentration increased only in the lowest dose of Pb. Therefore the highest dose of lead plus TiO₂ resulted in higher concentration of serotonin compared to control group. Even at low concentrations, Pb and TiO₂ were able to alter some biomarkers. Most importantly, when associated were able to interact and some changes are more relevant than when isolated. However, further studies, showing the action mechanisms involved in these associations are needed.

Keywords: *Hoplias malabaricus*, TiO₂ nanoparticles, inorganic lead, biomarkers, autometallography, trophic exposure.

1 Introduction

The increasing worldwide contamination of freshwater systems with thousands of industrial and natural chemical compounds is one of the key environmental problems facing humanity. Although most of these compounds are present at low concentrations, many of them raise considerable toxicological concerns, particularly when present as components of complex mixtures (Schwarzenbach, 2006).

Nanotoxicology has emerged only recently, when various nanomaterials had already been introduced into a number of industrial processes and products. While we largely understand the properties of bulk materials and/or chemicals at the molecular level, there are new properties of materials being discovered in the zone between “molecule” and “bulk”, that is the nanoscale (Elsaesser and Howard, 2012). Different studies have reported the potential of metallic ions to adsorb on nanoparticles surface, because of reaction between the highly increased reactive surfaces of nanomaterials, due to the increased surface-to-volume ratio (Nowack and Bucheli, 2007; Jia *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Recillas *et al.*, 2011).

The development of nanotechnology on titanium dioxide nanoparticles (nano TiO₂) has continuously expanded their applications into photocatalyst, white pigment and sunscreen for skin, water treatment and self-cleaning glass due to their photocatalytic and antibacterial properties (Kim *et al.*, 2010; Recillas *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012). With its large production and growing applications, nano TiO₂ is rapidly entering the aquatic environment and thus presents increasing risks due to its documented bioavailability and aquatic toxicity (Sharma, 2009). The environmental effect is due not only to the toxicity of nanomaterials themselves, but also to the capacity of nanoparticles to modify bioavailability of other toxic pollutants such as heavy metals and toxic organics (Baun *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2010). Though different authors have reported low toxicity of nano TiO₂ (Wang *et al.*, 2011; Kahru and Dubourguier, 2010; Menard *et al.*, 2011), but very few is known about its influence on toxicity of other metallic pollutants.

Among the many classes of contaminants, metals are an especial environmental problem due to their persistence, long-range transport and potential to

bioconcentrate and bioaccumulate up to high levels in aquatic organisms (Franco-Uría *et al.*, 2010). Inorganic lead (Pb) is the most abundant heavy metal in the Earth's crust and its global contamination resulting from human activities remains significant (Tong *et al.*, 2000 – WHO Pb bulletin). Pb is a highly toxic metal with no known beneficial function in biological systems (Pabello and Lawrence, 2006), being toxic to aquatic organisms even at low concentrations. Pb effects include imbalance of ion regulation including Ca^{2+} homeostasis (Rogers *et al.* 2003), changes in hematological parameters such as reduction of total leukocytes, the average cell volume, number of erythrocytes and hematocrit (Ates *et al.*, 2008), morphological changes in the liver as haemosiderosis and necrosis, areas of swelling and hemorrhage in the brain, as well as disturb the neurotransmission systems (Adeyemo, 2008). Recently we have demonstrated the morphological, biochemical and genetic deleterious effects of lead in *Hoplias malabaricus* after throphic exposure (Alves Costa *et al.*, 2007; Rabitto *et al.*, 2007)

With the increase of TiO_2 in the environment due to the expanded development of nanotechnology and the known availability of inorganic lead (Zhu *et al.*, 2010a; Zhu *et al.*, 2010b; Hu *et al.*, 2011), the evaluation of associated effects was aimed in the current study in order to attempt an also recent question in ecotoxicology: Can the mixture of contaminants interfere with the isolated toxicity?

The present study investigated the hepatic and neural effects of Pb and TiO_2 nanoparticle, under more realistic throphic exposure after isolated and in combination, in the Neotropical predator fish *Hoplias malabaricus*.

2. Materials and methods

2.1 Fish

Specimens of adults *Hoplias malabaricus* (300–500 g) were obtained from a commercial fish farm (Garuva City, Santa Catarina State, Brazil) and maintained in 200 L water tanks with dechlorinated tap water for 4 weeks before the experiments. Fish were kept at constant aeration, temperature at 25°C and 12 hr photoperiod. Animals were fed every 5 days.

2.2 Pollutants and preparation of solutions

TiO₂ nanoparticles with average sizes of 21 nm and surface area of 35-65 m²/g (Sigma-Aldrich®), and lead(II) acetate 99.95% purity ((CH₃COO)₂Pb - Alfa Aesar®) were used in this work. Both pollutants were prepared in distilled water, the solutions/suspensions were mixed with a sonicator probe (10 cycles of 2min), for dissolving possible aggregates of nano TiO₂.

2.3 Experimental design

A number of 64 fish were randomly distributed into eight experimental groups, and kept in aquaria of 100L. Fish were exposed to either Pb (0.1, 1 and 10 mg.kg⁻¹ per dose) respectively Pb1 Pb2 and Pb3, nano TiO₂ (150 µg.kg⁻¹ per dose) or combinations (TiO₂ plus Pb1, Pb2 and Pb3), and a control group under the same conditions. The exposure was performed each 5 days through gavage of vehicle (H₂O), Pb, nano TiO₂ or combinations solution/suspension and followed by carp (*C. carpio*) force feeding. The administered contaminant volume was adjusted according to predator biomass before exposure. After 70 days of exposure time (14 individual doses), fish were anesthetized with benzocaine (200 ppm in water), weighted, the blood was collected, and killed through medullar section. All the procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Canadian Council on Animal Care).

The intermediate dose of Pb was established according to the levels measured in fish liver. From this, one 10-fold lower (0.1 mg.kg⁻¹ per dose and one 10-fold higher (10 mg.kg⁻¹ per dose) dose were tested. The dose of nano TiO₂ was established applying a bioaccumulation constant of ten times to the predictions about the nano TiO₂ in aquatic environment (Türkmen et al., 2008; Abdallah, 2008; Lima et al., 2002; Menard et al., 2011).

2.4 Sample preparation

The blood (about 1.5 ml) was collected centrifuged and the plasma was frozen at -80°C for determination of biochemical parameters. After fish death, the liver was

sampled, weighted and fixed as described above. The brain and muscle were sampled and frozen at -80°C for measurement of neurotransmitters and Pb, respectively. The hepatosomatic index was calculated according to the formula: (liver weight/body weight) x 100.

2.5 Biochemical analysis and Pb measurement contents

The plasma was defrosted and processed in an automated biochemical analyzer (Selectra E, Vital Scientific, Holanda) for biochemical parameters alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) measurement. For measurement of Pb contents the digestion procedure by McDaniel (1992) was applied, and metal extraction was performed according to Creed *et al.* (1992). Three grams of sample was added to 5ml of nitric acid P.A. and 4ml of 30% peroxide hydrogen and heated at 80°C for 30min. The solution was filtered on glass fiber paper, and the Pb analysis was performed using an optic emission spectrophotometer (VARIAN 720 ES).

2.6 Liver histopathology and autometallography

Liver samples were preserved in Alfac fixative solution for 16 h (ethanol 80% - 85 mL; formaldehyde 40% - 10 mL; glacial acetic acid – 5mL) (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2012), dehydrated in a graded series of ethanol baths and embedded in Paraplast Plus resin (Sigma®). Sections of 5 µm were stained in Haematoxylin and Eosin (Woods and Ellis, 1994) and observed in Zeiss Axiophot photomicroscope. Results were expressed as a prevalence of fish with histopathological lesions, and liver alteration indexes were determined according to Bernet *et al.* (1999). For the autometallography, the protocol proposed by Danscher (1994) and modified by Mela *et al* (2012) was carried out. The basic principle can be summarized as the formation of shells of metallic silver around nuclei of trace metals, after covering the biological section with an emulsion (Ilford Nuclear emulsion L4) and placing it in a bath of developer under a safelight. After drying in complete darkness (15 min), tissue sections were rinsed in developer (Ultrafin tetenal, AGFA) for 15 min, in stop bath (1% acetic acid) for 1 min and in fixer (B&W Fixer, AGE, AGFA) for 10 min. Before every experiment, the emulsion was checked to test uniformity of silver grains, by

covering a slide without sections. Metal deposits appear as black silver deposits (BSD) indicating the presence of silver shells around the metals.

2.7 Neurotransmitters measurement

Endogenous levels of neurotransmitters were assayed by reverse-phase HPLC with electrochemical detection (ED). The brain tissue samples were homogenized with an ultrasonic cell disrupter (Sonics, Newtown, CT, USA) in 0.1 M perchloric acid. After centrifugation at 10000 *g* for 30 min, 20 μ l of the supernatant were injected into the chromatographer. The mobile phase, used at a flow rate of 1 ml/min, had the following composition: 20 g citric acid monohydrated, 200 mg octane-1-sulfonic acid sodium salt, 40 mg ethylene- diaminetetraacetic acid (EDTA), 900 ml HPLC-grade water, 10% methanol and pH 4. The peak areas of the external standards were used to quantify the sample peaks.

2.8 Statistical procedures

Nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunns post test were performed for all parameters. Comparisons of the experimental and control group and, the TiO₂ with the TiO₂ + Pb groups, and Pb with their respective mixture groups TiO₂ + Pb were carried out. $p < 0.05$ was assumed as statistically significant.

3. Results

No mortality, no signs of mobility changes and no skin lesions were observed in the control and experimental groups during the experiment. Pb was not detected in the muscle of any fish group (detection limit = $<0.10\text{mg/Kg}$). The hepatosomatic index of exposed fish did not showed difference with control control group, but it was 17% lower in the association $\text{TiO}_2+\text{Pb3}$ (0.81 ± 0.03) compare to TiO_2 (0.98 ± 0.07).

3.1 Biochemical parameters

Alanine transaminase (ALT) activity was higher in Pb3, $\text{TiO}_2+\text{Pb1}$ and $\text{TiO}_2+\text{Pb2}$ groups compared to the control group (Figure 1A), no interact effect was observed. But aspatate transaminase (AST) activity was not altered by exposure to either contaminants (Figure 1 B).

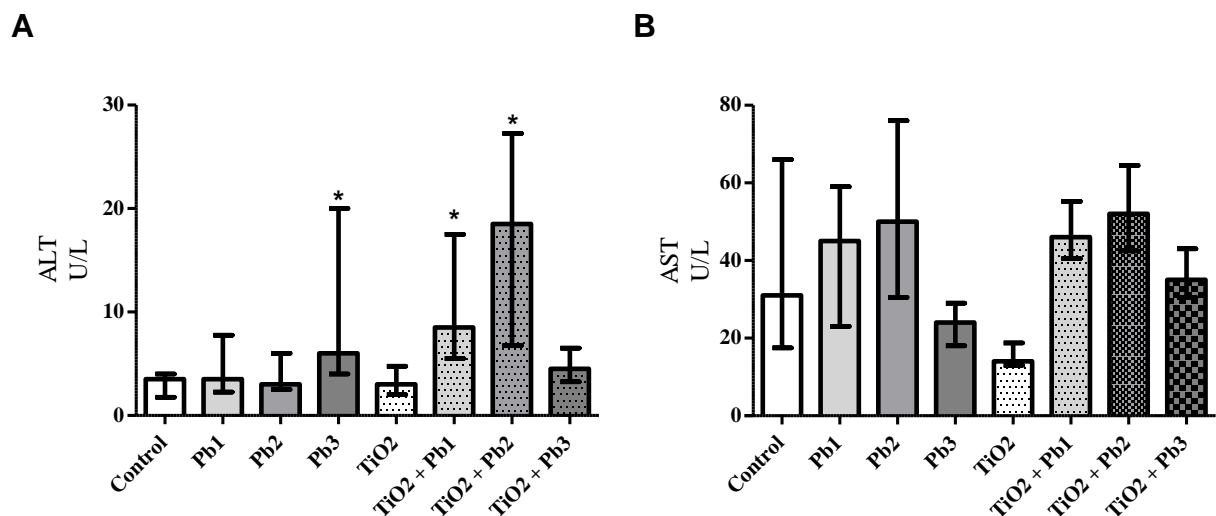


Figure 1. Activity of alanine transaminase (A) and aspartate transaminase (B). Median and interquartile range. Asterisks (*) indicate difference between exposed groups and control. Experimental groups: control, Pb1 (0.1 mg.kg^{-1}), Pb2 (1.0 mg.kg^{-1}), Pb3 (10 mg.kg^{-1}), TiO_2 ($150\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$), $\text{TiO}_2+\text{Pb1}$, $\text{TiO}_2+\text{Pb2}$ and $\text{TiO}_2+\text{Pb3}$. $p < 0.05$ Kruskal-Wallis, Dunns.

3.2 Histopathology and autometallography

The hepatic tissue of *H. malabaricus* from the control group showed a typical pattern already described for most of teleost fish (Fig. 2A). However, the hepatic tissue revealed important alterations after exposure to $\text{TiO}_2+\text{Pb1}$ and $\text{TiO}_2+\text{Pb3}$

groups as: melanomacrophages centers (MMCs) (Fig.2B), necrosis areas (Fig.2C) and pre-necrotic areas (Fig. 2D). Alteration index was not different among individuals exposed to Pb (Fig. 3A), but increased after TiO_2 +Pb1 and TiO_2 +Pb 3 groups in comparison to control group (Fig. 3B). TiO_2 +Pb3 present higher lesion index than TiO_2 and Pb3 groups (Fig. 3B and 3C). Metal deposits were easily distinguished as Black Silver Deposits (BSD) under the light microscope in Pb3 (Fig. 4B) and TiO_2 +Pb3 groups (Fig. 4C). Differently, the livers from control animals did not reveal the presence of BSD by autometallography analysis (Fig. 4A).

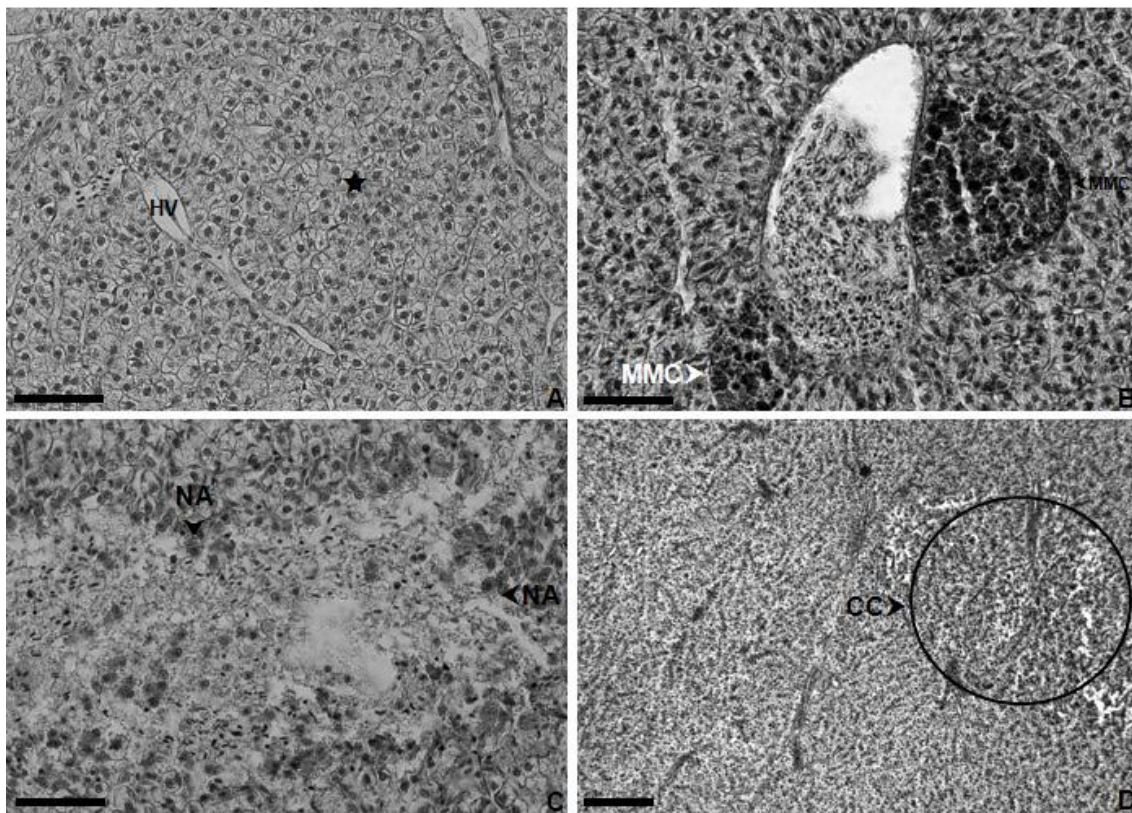


Figure 2: Structural organization of liver of *Hoplias malabaricus* counterstained with hematoxylin/eosin. (A) Liver of control fish - Hepatic parenchyma (★) and hepatic vein (HV), (Scale bar = 100 μm). (B) Liver of *H. malabaricus* exposed to TiO_2 +Pb3 - Melano-macrophage centers (MMC), (Scale bar = 100 μm). (C) Liver of *H. malabaricus* exposed to TiO_2 - Areas of necrosis (NA), (Scale bar = 100 μm). (D) Liver of *H. malabaricus* exposed to TiO_2 +Pb3 - Circulatory changes (CC), (Scale bar = 200 μm).

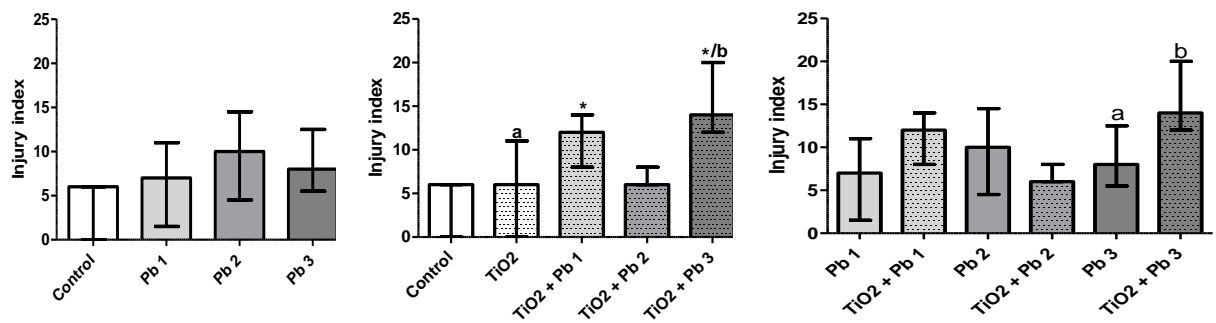


Figure 3: Injury index determined according to Bernet *et al.* (1999). Median and interquartile range. Asterisks (*) indicate difference between exposed groups and control; letters indicate differences between TiO₂+Pb, and Pb or TiO₂. Experimental groups: control, Pb1 (0.1 mg.kg⁻¹), Pb2 (1.0 mg.kg⁻¹), Pb3 (10 mg.kg⁻¹), TiO₂ (150 µg.kg⁻¹), TiO₂ + Pb1, TiO₂ + Pb2 and TiO₂ + Pb3. $p < 0.05$ Kruskal-Wallis, Dunns.

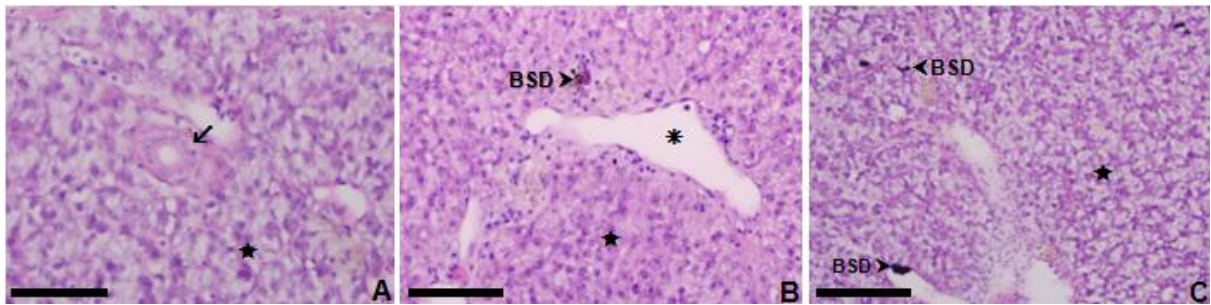


Figure 4: Autometallographical demonstration of silver deposits in cross section of liver from *Hoplias malabaricus* counterstained with Hematoxylin-eosin. (A) Control group. No silver deposits was visualized. Hepatic parenchyma (★) and biliary ducts (↙). (Scale bar = 100 µm). (B) Pb3 group. Section showing black silver deposits (BSD – arrow-heads) in hepatocytes. Hepatic parenchyma (★) and Hepatic vein (*) (Scale bar = 100 µm). (C) TiO₂ + Pb3 group. Black silver deposits (BSD – arrow-heads) visualized on hepatocyte cytoplasm and inside the hepatic vein. (Scale bar = 100 µm).

3.3 Brain Neurotransmitters

Serotonine (5-HT) concentration increased only in the lowest dose of Pb (Pb1) (Figure 5A). Likewise, association of TiO₂ + Pb3 resulted in higher concentration of serotonin compare to control group (Figure 5B). The TiO₂+Pb groups were not significantly different from the TiO₂ or Pb (Figure 5C). Neither dopamine nor noradrenaline was disturbed by exposure in any group (data not shown).

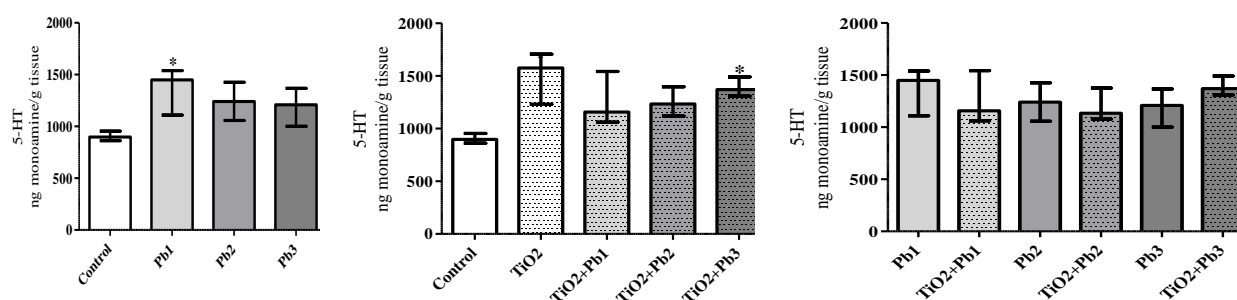


Figure 5: Serotonin (5-HT) concentration in nanomoles of monoamine per g of tissue. The bars are the median with interquartile range. Asterisks (*) indicate difference between exposed groups and control. Median and interquartile range. Asterisks (*) indicate difference between exposed groups and control; letters indicate differences between $\text{TiO}_2 + \text{Pb}$, and Pb or TiO_2 . Experimental groups: control, Pb1 (0.1 mg.kg^{-1}), Pb2 (1.0 mg.kg^{-1}), Pb3 (10 mg.kg^{-1}), TiO_2 ($150 \mu\text{g.kg}^{-1}$), $\text{TiO}_2 + \text{Pb1}$, $\text{TiO}_2 + \text{Pb2}$ and $\text{TiO}_2 + \text{Pb3}$. $p < 0.05$ Kruskal-Wallis, Dunns.

4. Discussion

The bioaccumulation of lead was not detected in muscle of *H. malabaricus* in the current study confirming the low affinity of the metal to the tissue. The chemical analysis of lead in liver was not possible due to the absence of enough material, but the presence of lead in liver was detected by autometallography (AMG) showing the affinity of the metal to the tissue, as described by Kosnett (2003). According to the author lead is distributed in three compartments: blood, soft tissues such as liver and kidneys, and hard tissues such as bones and teeth. Autometallography is a useful method for the studies of metal distribution in tissues of animals which have low to moderate metal concentration accumulation helping in the identifications of target sites (Horky *et al.*, 2002; Dimitriadis and Papadaki, 2004; Mela *et al.*, 2010, 2012). As might be expected, the groups exposed to higher concentrations of Pb, either alone or associated presented the more markings of AMG. Other authors have reported Pb concentrations ranging from 0.21 to 1.28 mg/kg in fish muscle, versus 0.40 to 7.15 mg/kg Pb in fish liver (Turkmen *et al.*, 2006, 2008; Tepe *et al.*, 2007; Dural *et al.*, 2007; Tapia *et al.*, 2006). Despite of that, apparently muscle is not the first tissue for lead bioconcentration, which can explain the absence of detection in muscle in *H. malabaricus* and the AMG finding.

Hepatosomatic index is considered an useful indicator about health fish, it indicates any condition that increase energy expenditure or increased hepatic lipid retention. The decreased index observed in $\text{TiO}_2 + \text{Pb3}$ group compared to TiO_2 may

be related to increased energy demand in TiO₂ +Pb3 group corroborating with the related more pronounced toxic effects observed in this group.

The ALT was found increased in Pb3, TiO₂+Pb1 and TiO₂+Pb2 groups, no interactive effects were observed. This data is in agreement with others studies which reported that lead has hepatotoxic effect (Abdou *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2012). Zhang *et al* (2010) exposed acutely mice to nano TiO₂ and Pb simultaneously, and also found ALT activity increased. In general, a high plasma ALT activity is accompanied by high liver microsomal membrane fluidity, free radical generation and alteration in the liver histology (Ibrahim *et al.*, 2012). The aminotransferases, alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), constitute a group of enzymes that catalyze the interconversion of amino acids and α -ketoacids by transfer of amino groups. An increase of enzyme activity in the extracellular fluid or plasma is an indicator of cellular damage since the levels of these enzymes within the cell exceed those in the extracellular fluids by more than three orders of magnitude (Van der oost *et al.*, 2003). Although the plasma levels of both AST and ALT become elevated whenever disease processes affect liver cell integrity, ALT is the more specific enzyme for the liver (Van der oost *et al.*, 2003). Indeed, we found alterations to ALT activity but no to AST activity.

Histopathological changes in liver, which may affect fish health, increased in individuals from TiO₂+Pb1 and TiO₂+Pb3 groups compare to control group. The most preponderant alterations were necrosis and leucocytes infiltration. Hepatocyte necrosis is a common pathologic response to toxin exposure in the liver and reflects the cell death and consequently the tissue or organ failure depend on the frequency. This is an irreversible damage associated in general with acute or even subchronic exposure. Alves Costa *et al.* (2007) also described the occurrence of necrosis in *H. malabaricus* after trophic exposure to lead in liver (14 doses of 21 $\mu\text{g.g}^{-1}$). The presence of a large number of white blood cells, such as leucocytes, in the liver may be a strong evidence for the occurrence of cell death (Rabitto *et al.*, 2005). As previously mentioned, the Pb interferes with the calcium balance in the cells, and this may contribute to the cell death. Alteration damage index was significant increased in the groups associated with nano TiO₂, and most importantly, a potentiated effect was observed for TiO₂+Pb3 group, which was different from TiO₂ and Pb3 isolated. These results are corroborated by the observation that titanium dioxide nanoparticles can

cause apoptosis in mammalian cells (Rahman *et al.*, 2002), and that liver necrosis were more abundant in TiO₂+Pb exposed mice when compare to isolated pollutants (Zhang *et al.*, 2010).

Environmental exposure to Pb has been associated with learning and cognitive deficits. Learning and memory is thought to involve plastic changes in the efficacy of synaptic transmission as well as formation and consolidation of new synapses. Thus, interference with these processes could be an important factor underlying neuro behavioral toxicity of Pb exposure (Pabello and Lawrence, 2006). In the current study was reported the effects of TiO₂ and Pb on the levels of three key neurotransmitters: dopamine (DA), noradrenaline (NA) and serotonin (5-HT). Although DA and NA did not altered in tested groups, serotonin levels have increased in Pb1 and TiO₂+Pb3 groups. In the central system nervous (CSN), 5-HT is a neurotransmitter whose functions include modulation of mood, emotion, sleep, and appetite, and it is, therefore, implicated in the control of a variety of behavioral and physiological functions. Because 5-HT stimulates a number of specific receptor types, it can exert different effects on its various cellular targets (Pabello and Lawrence, 2006). Lead exposure in rodents has been reported to interfere with the transmission of serotonin, and some authors have suggested a biphasic dose response of Pb on serotonergic function/activity. Exposure to high levels of Pb produced regional alterations in monoamine content with increases in 5-HT, and lowered 5-HT levels have been associated with low level Pb exposure (Kala and Jadhav, 1995; Leret *et al.*, 2002). This biphasic behavior has not been observed for *H. malabaricus*, since the lowest Pb dose (Pb1) and association of TiO₂ with the highest Pb dose (TiO₂+Pb3) increased 5-HT concentration. Lead can enter cells via calcium channel and activate process normally caused by calcium such as activation of protein kinase C, which can release calcium from intracellular stores and causes release of excitatory neurotransmitters (Raunio and Tahti, 2001). Apparently the association of nano TiO₂ with Pb was able to modulated the Pb effect in 5-HT, possibly interfering with the effect of Pb on the balance of calcium. According to Trudeau (2005) two important neurotransmitter systems have direct relevance to the endocrine-disrupting potential of pharmaceuticals found in the aquatic environment, serotonin (5-HT) and GABA. According to the present results, metallic pollutants as

Pb and TiO₂, are also able to interact with serotonin system and a possible endocrine-disrupting potential effect could be thought, but further studies are needed.

Conclusion

According to our results, even at low concentrations, Pb and TiO₂ were able to altered some biomarkers. Most importantly, some observed changes were more relevant when they were associated. However, further studies, showing the mechanisms involved in these associations are needed.

Acknowledgements. This research was supported in part by CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology).

References

- Abdou, Z.A., Attia, M.H., Raafat, M.A., 2007. Protective effect of citric acid and thiol compounds against cadmium and lead toxicity in experimental animals. *J Biol Chem Environ Sci.* 2, 481-497.
- Adeyemo, O. K., 2008. Histological alterations observed in the liver and brain of *Clarias gariepinus* exposed to chronic sublethal dose of lead. *Bull. Eur Assn. Fish. P.* 28, 105-114.
- Abdallah, M. A. M. 2008. Trace element levels in some commercially valuable fish species from coastal waters of Mediterranean Sea, Egypt. *J. Mar. Syst.* 73, 114–122.
- Alves Costa, J. R. M., Mela, M., Silva Assis, H. C., Pelletier, E., Handi, M. A. F., Olivira, R. C. A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological aspects as biomarker to dietary lead (II) and methylmercury exposure to neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82-88.
- Ates, B., Orun, I., Talas, Z. S., Durmaz, G., Yilmaz, I., 2008. Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb^{2+} and Cu^{2+} . *Fish Physiol. Biochem.* 34, 53-59.
- Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K., Kusk, K.O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology.* 17, 387-395.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis.* 22, 25–34.

Danscher, G., 1994. Autometallography: A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochemistry.* 81, 331–335.

Dimitriadis, V.K., Papadaki, M., 2004. Field application of autometallography and X-ray microanalysis using the digestive gland of the common mussel. *Ecotoxicol Environ Saf.* 59, 31–37.

Dural, M., Goksu, M. Z. L., Ozak, A. A., 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chem.* 102, 415–421.

Elsaesser, A., Howard, C. V., 2012. Toxicology of nanoparticles. *Adv Drug Deliver Ver.* 64, p.129–137.

Franco-Uría, A., Otero-Muras, I., Balsa-Canta, E., Alonso, A.A., Roca, E., 2010. Generic parameterization for a pharmacokinetic model to predict Cd. *Chemosphere.* 79, 377–386.

Horky, D., Illek, J., Pechova, A., 2002. Histochemical and ultrahistochemical localization of heavy metals in calf organs. *Microsc Res Tech.* 56, 435–50.

Hu, X., Chen, Q., Jiang, L., Yu, Z., Jiang, D., Yin, D., 2011. Combined effects of titanium dioxide and humic acid on the bioaccumulation of cadmium in Zebrafish. *Environ Pollut.* 159, 1151-1158.

Ibrahim, N.M., Eweis, E.A., Beltagi, H.S., Mobdy, I. E., 2012. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pacific Jour. Trop. Biomed.* 41-46.

Jia, K., Pan, B., Lva, L., Zhang, Q., Wang, X., Pan, B., Zhang, W., 2009. Impregnating titanium phosphate nanoparticles onto a porous cation exchanger for enhanced lead removal from waters. *J. Colloid Interface Sci.* 331, 453–457.

Kahru, A., Dubourguier, H., 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology.* 269, 105–119.

Kala, S.V., Jadhav, L., 1995. Region-specific alterations in dopamine and serotonin metabolism in brains of rats exposed to low levels of lead. *Neurotoxicology.* 16, 297–308.

Kim, K. T., Klaine, S.J., Cho, J., Kim S.H., Kim, S.D., 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Sci Total Environ.* 408, 2268–2272.

Kosnett, M. J., 2003. Intoxicação por Metais Pesados e Quelantes. In: KATZUNG, Bertram G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 8.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 867-870.

Leret, M.L., Garcia-Uceda, F., Antonio, T., 2001. Effects of maternal lead administration on monoaminergic, GABAergic and glutamatergic systems. *Brain Res Bull.* 58, 469–73.

Lima Junior, R. G. S., Araujo, F. G., Maia, M. F., Braz Pinto, A. S., 2002. Evaluation of Heavy Metals in Fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Res.* 89, 171-179.

Mela, M., Cambier, S., Mesmer-Dudons, N., Legeay, A., Grotzner, S.R., Oliveira Ribeiro, C.A., 2010. Methylmercury localization in Danio rerio retina after trophic and subchronic exposure: a basis for neurotoxicology. *Neurotoxicology.* 31, 448–53.

Mela, M., Grötzner, S. R., Legeay, A., Mesmer-Dudons, N., Massabuau, J. C., Fix Ventura, D., Oliveira Ribeiro, C. A., 2012. Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. *Neurotoxicology.* 33, 407–415

Menard, A., Drobne, D., Jemec, A., 2011. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environ Pollut.* 159, 677-684.

Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5–22.

Oliveira Ribeiro, C. A., 2011. Fixação Biológica, in: Oliveira Ribeiro, C. A., Grotzner, S.R., Reis Filho, H.S (eds.). *Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia*. 1ed. São Paulo: Santos, pp. 1-40.

Pabello, N.G., Lawrence, D.A., 2006. Neuroimmunotoxicology: Modulation of neuroimmune networks by toxicants. Clin. Neuro. Res. 6, 69–85.

Rabitto, I., Alves Costa, J. R. M., Akaishi, F. M., Silva De Assis, H. C., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C. A., 2005. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60, 147–156,

Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D.G., Schiffmann, D., 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. Environ. Health Perspect. 110, 797–800.

Raunio, S., Tahti, H., 2001. Glutamate and calcium uptake in astrocytes after acute lead exposure. Chemosphere. 44, 355-359.

Recillas, S., García, A., González, E., Casals, E., Puentes, V., Sánchez, A., Font, X. 2011. Use of CeO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of lead from water. Toxicity of nanoparticles and derived compounds. Desalination. 277, 213–220.

Rogers, J. T.; Richards, J. G.; Wood, C. M., 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat Toxicol. 64, 215-234.

Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. Science. 313, 1072-1077.

Sharma, V.K., 2009. Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment: a review. *J. Environ. Sci. Health A*. 44, 1485-1495.

Tapia, J., Duran, E., Pena-Cortes, F., Hauenstein, E., Bertran, C., Schlatter, R., 2006. *Micropogonias manni* as a bioindicator for copper in Lake Budi (IX Region, Chile). *J. Chil. Chem. Soc.* 51, 901–904.

Tepe, Y., Turkmen, M., Turkmen, A. 2007. Assessment of heavy metals in two commercial fish species of four Turkish seas. *Environ Monit Assess.* 146, 277-284.

Tong, S., Schirnding, Y. E., Prapamontol, T., 2000. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *B World Health Organ.* 78, 1068-1077.

Trudeau, V. L., Metcalfe, C. D., Mimeault, C., Moon, T. W., 2005. Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish? *Biochem Mol Biol Fishes Biochem.* 6, 476-494.

Turkmen, A., Turkmen, M., Tepe, Y., Mazlum, Y., Oymael, S., 2006. Heavy metal levels in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) and Mullet (*Mugil cephalus*) in Iskenderun Bay (North Eastern Mediterranean, Turkey). *B Environ Contam Tox.* 77, 186–193.

Türkmen, M., Türkmen, A., Tepe, Y., Töre, Y., Ates, A., 2008. Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas. *Food Chem.* 108, 794-800.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2002. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Environ Toxicol Phar.* 13, 57-149.

Yu, Y., Wang, J., Parr, J.F. 2012. Preparation and properties of TiO₂/fumed silica composite photocatalytic materials. *Procedia Eng.* 27, 448-456.

Wang, D., Hu, J., Irons, D. R., Wang, J., 2011. Synergistic toxic effect of nano-TiO₂ and As(V) on *Ceriodaphnia dubia*. *Sci Total Environ.* 409, 1351-1356.

World Health Organization (WHO). 2000. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *B World Health Organ.* 78, 1068-1078.

Zhang, X., Lin, S., Lu, X.-Q., Chen, Z., 2010. Removal of Pb(II) from water using synthesized kaolin supported nanoscale zero-valent iron, *Chem. Eng. J.* 163, 243–248.

Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010a. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 78, 209–215.

Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010b. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere.* 79, 928–933.

4 DISCUSSÃO GERAL

Um organismo tem duas principais formas de eliminar uma substância química: ou excretado na sua forma original, ou biotransformado pelo organismo. O órgão mais comumente envolvido na biotransformação de compostos estranhos, é o fígado, por causa de sua função, posição e suprimento sanguíneo (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Metais, como Pb e a nano TiO_2 não são metabolizados por vias de biotransformação que normalmente atuam sobre as moléculas orgânicas, porém suas concentrações podem ser moduladas por “sequestradores”, tais como, proteínas do plasma, metalotioneínas, albumina e outros, como o GSH e outros pequenos tióis. Assim, quando os metais estão livres ou presentes em excesso, o seu carácter electrofílico pode levar a interações com grupos SH de proteínas, que afetam a sua função e desregulam processos importantes como metabolismo de outras substâncias, funções neurais e parâmetros de estresse oxidativo.

Neste estudo, a atividade da SOD não foi alterada por nenhuma dose de Pb ou nano TiO_2 . No entanto, a atividade da CAT aumentou em resposta ao Pb e TiO_2 quando comparados ao controle (45% - Pb 2 / 35% - Pb 3 / 30% - TiO_2 / TiO_2 + Pb1 - 41%). E apesar de a GPx não ter sofrido alterações, a enzima responsável por restaurar seu cofator (GSH) a GR, bem como o seu cofator sofreram alterações. Estes são importantes resultados, uma vez que a SOD, juntamente com a CAT e a GPx, são consideradas a primeira linha de defesa antioxidante enzimática. E o fato de a atividade da SOD bem como da GPx não terem sido induzidas em nenhum grupo, mesmo com a atividade aumentada de outras enzimas passo chave desta via, como segue discutido, pode demonstrar o desbalanço na produção e eliminação dos radicais livres / espécies reativas (ERs)

A atividade da GR sofreu 31% de aumento no grupo TiO_2 + Pb3 em relação ao controle. Possivelmente, este aumento pôde servir para compensar a falta de resposta da CAT neste grupo, através da restauração GSH reduzido (ATLI e CANLI, 2010). GSH é considerada o principal sistema não-enzimático de tamponamento antioxidante, atuando como cofator da GPx e GST (COMMANDEUR *et al.*, 1995). O GSH aumentou frente a exposição ao Pb 2 (104%), Pb 3 (204%) e TiO_2 + Pb3

(165%) em relação ao controle. No entanto, não houve interação estatisticamente significativa entre Pb e TiO₂.

O aumento da atividade da G6PDH observado em Pb3 reflete o incremento da via das pentoses-fosfato, responsável pela produção de NADPH (CARVALHO e FERNANDES, 2008). NADPH é um “sequestrador” de radicais, atua como cofator da GR, sendo importante para a manutenção do GSH reduzido. Este fato corrobora o resultado do GSH, pois o grupo Pb3, foi o que sofreu maior aumento na concentração do GSH (204%) em relação ao controle, e maior ainda que seu correspondente mistura TiO₂ + Pb3 (165%), apesar de não ter sido observada diferença estatística entre estes dois.

Quando as defesas antioxidantes são ineficazes em controlar as espécies reativas de oxigênio (ROS), as biomoléculas podem ser danificadas. O fígado de *H. malabaricus* tem defesas antioxidantes robustas que conseguiram evitar o aumento da peroxidação lipídica (LPO) nos grupos de Pb e de nano TiO₂, mas estas não foram suficientes para impedir a carbonilação de proteínas (PCO), a qual aumentou no grupo Pb3 (41%), TiO₂ + Pb2 (53%) e TiO₂ + PB3 (69%). Proteínas são um importante alvo para os radicais livres (TSENG *et al.*, 2011). Os grupamentos carbonils podem ser introduzidos nas proteínas por uma série de vias diferentes, predominantemente através da oxidação catalisada por metal (MCO), mas também através de lípidos oxidados ou açúcares contendo carbonils (REQUENA *et al.*, 2003). A carbonilação resulta em modificações nas cadeias laterais de proteínas, o que frequentemente leva a mudanças conformacionais e perda de função.

O Pb causou inibição da δ -ALAd no grupo Pb 3 (54%), e aparentemente a nano TiO₂ evitou essa inibição. A δ -ALAd é essencial para a síntese de heme e tem um papel antioxidante indireto através da redução do ácido aminolevulínico (ALA). O acúmulo de ALA promove a liberação de espécies reativas de oxigênio da ferritina, contribuindo deste modo para o estresse oxidativo e potencialmente hemólise (WOOD *et al.*, 2012). O Pb é classicamente conhecido por ter influências danosas na síntese do grupamento heme em diferentes espécies, e nosso resultado surpreendentemente mostrou que quando a mesma dose de Pb foi associada com a nano TiO₂, este efeito não ocorreu (PEROTTONI *et al.*, 2004; GURER-ORHAN, 2004)

Quanto as metalotioneínas (MTs), a exposição ao Pb e a nano TiO₂ não afetou a sua concentração em comparação com o controle, mas a interação com a TiO₂ pareceu diminuir a biodisponibilidade do Pb, conduzindo a concentrações mais baixas de MTs em TiO₂ + Pb1 quando comparado ao grupo Pb1, este efeito demonstra interação entre estes poluentes, da mesma forma que o resultado referente a atividade da δ -ALAD também demonstrou. A expressão das MTs pode ser induzida pela exposição a metais, aumentando a tolerância fisiológica de organismos a estes (ANDREWS, 2000).

O grupo Pb 1, o qual teve aumento das MTs em comparação ao seu correspondente mistura, não sofreu indução da CAT, e o contrário pode ser observado no TiO₂+Pb 1, uma vez que não houve aumento das MTs, possivelmente uma outra linha de defesa foi requerida, neste caso as CATs, e em ambos os casos estas respostas foram capazes de impedir efeitos mais danosos como os danos às biomoléculas (LPO, PCO).

Em relação ao grupo Pb 2, não houve em nenhum grupo diferença significativa entre o mesmo e seu correspondente mistura (TiO₂+Pb 2), porém, quando ambos foram comparados com o controle, fica evidente que o grupo Pb 2 sofreu mais alterações (\uparrow CAT e \uparrow GSH) que o TiO₂+Pb 2, o qual não teve nenhuma alteração. E mais, da mesma forma que a presença da nano TiO₂ aparentemente foi capaz de diminuir os danos induzidos pelo Pb neste grupo, o aumento da CAT e GSH no grupo Pb 2 isolado também o foi, ficando as alterações restritas apenas ao aumento destes dois parâmetros.

Na maior dose de Pb, a atividade da GST foi maior em Pb 3 comparada a TiO₂+Pb 3, possivelmente pela presença da nano TiO₂. Uma vez que o grupo Pb 3 sofreu alterações em mais marcadores (CAT, GSH, G6PDH, PCO, δ -ALAD e GST) que o grupo TiO₂+Pb 3 (GR, GSH, GST e PCO), e ainda que a δ -ALAD só foi inibida no Pb 3, podemos com estes resultados associados supor, que de alguma maneira a nano TiO₂ diminuiu as respostas oxidativas do Pb no fígado de *H. malabaricus*, nas doses aqui apresentadas e sob a via de exposição utilizada.

As atividades das transaminases ALT e AST foram determinadas no plasma dos peixes, porém a AST não teve sua atividade alterada por nenhum tratamento. Três grupos apresentaram atividade da ALT aumentada em relação ao controle, o

Pb3, o TiO_2 +Pb1 e TiO_2 +Pb2, esta enzima, como referido (VAN DER OOST *et al.*, 2003), é responsável por catalisar a conversão da alanina a piruvato, e sua principal localização é o citoplasma de hepatócitos. Sendo assim, em situações onde haja o aumento da permeabilidade dos hepatócitos, seja por lise celular ou aumento da permeabilidade dos mesmos, a atividade desta enzima pode estar aumentada no soro e ser então relacionada ao dano hepático.

A concentração de chumbo no músculo dos peixes ficou a baixo do limite de detecção ($>0,10$ mg/Kg). Como anteriormente citado, o principal tecido de distribuição do Pb não é o músculo, o que pode em parte, explicar a ausência de detecção neste tecido, no entanto, através da autometalografia podemos visualizar a presença de metais distribuídos ao longo do tecido hepático. A concentração de Pb em peixes oriundos de diferentes ambientes é cerca de 5 vezes mais concentrado no fígado que no tecido muscular (TURKMEN *et al.*, 2006, 2008; TEPE *et al.*, 2007; DURAL *et al.*, 2007; TAPIA *et al.*, 2006).

O índice hepatossomático é considerado um bom indicador de qualquer condição que imponha um maior gasto de energia ou retenção lipídica refletindo em variação no peso relativo do fígado. Através do seu valor podemos inferir sobre a utilização de reservas metabólicas. A diminuição deste observada em TiO_2 +Pb3 em relação ao grupo TiO_2 , sugere uma maior demanda das reservas energéticas neste grupo, possivelmente devido ao efeito tóxico mais pronunciados neste grupo.

Ainda no que se refere à função hepática, o índice de dano hepático bem como a presença de metais foram conduzidos através da histopatologia e autometalografia respectivamente. A histopatologia nos dá idéia qualitativa da estrutura hepática, e o uso do índice de Bernet *et al* (1999) nos possibilita a análise quantitativa dos danos causados a essa estrutura, de forma que podemos fazer comparações estatísticas entre populações expostas à condições diversas. O chumbo isolado não causou danos significativamente diferentes do controle em nenhuma das doses testadas. Porém quando o mesmo foi associado a nano TiO_2 , esta diferença apareceu em dois grupos, no mistura com a menor dose de Pb o TiO_2 +Pb1, e com a maior dose o TiO_2 +Pb3. De forma qualitativa, as lesões mais frequentemente encontradas foram necrose, presença de leucócitos e colestase respectivamente. Ainda a quantificação dos centros de melanomacrófagos foi

determinada, porém este dado não apresentou diferença estatística em nenhum grupo (dado não demonstrado).

De forma não contundente, os resultados referentes à ALT não corrobora os dados da histologia. Uma vez que o aumento plasmático da ALT é um indicador de dano hepático, esperaríamos encontrar a mesma aumentada no plasma dos indivíduos que apresentaram maiores escores de injúrias histopatológicas, o grupo $\text{TiO}_2+\text{Pb3}$, porém contrariamente, o grupo Pb3 que apresentou aumento na atividade da ALT, não apresentou diferença no índice de injúrias. Assim, levantamos algumas hipóteses. Segundo Bishop *et al* (2010) após uma injúria severa níveis normais de aminotransferases podem ser encontrados, resultante da liberação exaustiva das mesmas pelos hepatócitos, uma vez que estes indivíduos foram expostos a estes poluentes de forma subcrônica, esta seria uma justificativa possível. Outra hipótese, não menos plausível, é que segundo Kroll *et al* (2009) algumas limitações são encontradas em testes *in vitro* quando usamos nanopartículas, principalmente as metálicas no caso aqui referido, elas podem interir nos ensaios resultando em falsos negativos ou falsos positivos. De acordo com este autor, a enzima lactato desidrogenase (LDH), enzima passo limitante no ensaio da atividade da ALT, pode ser inibida pela nanopartícula e o resultado final pode não representar a realidade, neste caso um falso negativo. Apesar de não podemos afirmar com certeza o fenômeno que ocorreu no grupo $\text{TiO}_2+\text{Pb3}$, podemos chamar a atenção para o fato de o achado do índice histopatológico ser mais contundente e definitivo que a alteração na atividade da ALT plasmática. Mesmo o grupo Pb3 tendo apresentado indução neste marcador plasmático indireto de dano hepático, o índice histopatológico nos diz que este dano ainda não foi tão irreversível, e contrariamente, apesar de os valores da ALT terem ficados baixos no grupo $\text{TiO}_2+\text{Pb3}$ o índice histopatológico mostrou um tecido já bastante lesionado.

No que diz respeito às funções nervosas, os níveis cerebrais totais de três neurotransmissores chaves foram dosados, dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT). A concentração da serotonina sofreu aumento em dois grupos Pb1 e $\text{TiO}_2 + \text{Pb3}$. Apesar da importância clínica e funcional da serotonina, não há um quadro fisiopatológico bem desenvolvido para explicar plenamente seus papéis. Não é muito preciso afirmar que o aumento geral de serotonina no SNC pode desencadear um ou outro distúrbio, pois há diferentes estruturas que responderão

de forma diferenciada, por sua vez, com o aumento ou a diminuição de serotonina. A redução de serotonina em estruturas límbicas, como o hipocampo, está longamente associada com distúrbios de humor, como depressão maior, contudo, o aumento desse neurotransmissor pode ocasionar transtornos de ansiedade (FINK e GOTHERT, 2007). O Pb mimetiza o cálcio no sistema nervoso central (SNC), entra nas células através de canais de cálcio, podendo ativar processos normalmente ativados por este íon, tais como ativação da proteína quinase C, levando a liberação dos estoques intracelulares de cálcio e consequente fusão das vesículas pré-sinápticas com a membrana axoneal, e então liberação de neurotransmissores (RAUNIO e TÄHTI, 2001). Aparentemente, a associação da nano TiO_2 com Pb foi capaz de modular o efeito do Pb sobre a 5-HT, talvez por interferir com o efeito do Pb sobre o balanço de cálcio.

Este mecanismo pode ter contribuído para o aumento encontrado na concentração cerebral da 5-HT, porém por não ser um mecanismo específico esperaríamos um desbalanço também nos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos. Como estes são sistemas complexos que desempenham diferentes papéis em áreas cerebrais distintas, e são requisitados por vários mecanismos, a ausência de variação na concentração de DA e NA, não significa que em regiões específicas os mesmos estejam normais. Por exemplo, um desequilíbrio que aumente essa concentração em uma dada região, concomitante a diminuição em outra região em ordem proporcional, poderia acabar anulando a diferença geral e mascarando tal efeito. Para descartar esta hipótese teríamos que dosar tais substâncias em regiões isoladas por funções específicas para cada um deles.

Diferentes estudos têm relatado o potencial de nanopartículas em adsorver íons metálicos, o que pode até mesmo torná-las úteis para a remediação da poluição de ambientes aquáticos (NOWACK e BUCHELI, 2007; JIA *et al*, 2009; ZHANG *et al*, 2010; RECILLAS *et al*, 2011), porém para maior segurança as mesmas devem estar fixadas a uma superfície, e não livres no ambiente.

Esta interação química parece ter diminuído a disponibilidade do Pb para interagir com alguns componentes celulares. Na verdade, essa interação pode ter evitado o aumento da G6PDH, GSH, GST, MTs, inibição δ -ALAD. Porém, outros biomarcadores, até mais tardios quanto ao dano, foram afetados apenas no grupo

mistura Pb + TiO₂ (GR e danos histopatológicos). Outros ainda foram alterados em ambos os casos como é o caso da concentração total de serotonina cerebral e atividade plasmática da alanina aminotransferase, desta forma essa interação química não pode ser considerada totalmente segura, pelo menos com este modelo de estudo.

É possível que a adsorção do Pb à nano TiO₂ tenha resultado em uma molécula estável nas condições fisiológicas, e muito grande para ser capaz de ativar mecanismos celulares mais refinados como os que o Pb isolado é capaz de ativar. Porém na ausência destas respostas celulares protetoras o tecido hepático teve danos mais pronunciados, como evidenciado pela histopatologia do mesmo.

Diferentes legislações preconizam os valores máximos permitidos para o Pb, já para a nano TiO₂, ainda não existe legislação. Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2008) para águas doces classe 3, as quais são aquelas onde haja a não verificação de efeito tóxico agudo a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, o limite máximo permitido é 0,03mg/L. Já para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1998) os limites permitidos variam de acordo com o alimento em que o mesmo é encontrado, sendo os menores permitidos para o leite fluído, pronto para consumo - 0,05 mg/kg, e os máximos para caramelos e balas, cacau, peixes, produtos da pesca e cefalópodes - 2,0 mg/kg. Logo, a dose intermediária de Pb, a partir da qual nos baseamos para as demais, ainda está dentro dos limites regulamentados para tecidos de peixes, e ainda para consumo humano. De modo que, apesar de ela ser apenas a metade do regulamentado pela ANVISA, e de a dosagem de Pb no músculo dos peixes intoxicados ter ficado a baixo dos limites de detecção, não evitou que várias alterações nos parâmetros investigados fossem encontrados.

Assim, sugerimos que os limites legais de concentração do metal Pb devem ser revisados. E apesar de não haverem limites estabelecidos para a emissão de nanopartículas ao ambiente, mais especificamente aqui a nano TiO₂, e ainda, apesar de as mesmas serem apontadas por diferentes estudos como pouco tóxicas, há que se levar em conta o potencial efeito modulador da presença destas no ambiente sobre os efeitos tóxicos de outras moléculas, pois como pudemos observar houve de

fato interação, seja ela química, ou de outra natureza, como por nós mostrado entre a nano TiO_2 e o Pb.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. A. M. Trace element levels in some commercially valuable fish species from coastal waters of Mediterranean Sea, Egypt. **Journal of Marine Systems**, v.73, p.114–122, 2008.

ADAMS, L.K., LYON, D.Y., MCINTOSH, A., ALVAREZ, P.J.J. Comparative toxicity of nano-scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions. **Water Science and Technology**, v. 54, p.327–334, 2006.

ADEYEMO, O. K. Histological alterations observed in the liver and brain of *Clarias gariepinus* exposed to chronic sublethal dose of lead. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v.28, p. 105-114, 2008.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR-USA). 2007. Toxicological profile for lead. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=96&tid=22>> acesso em dez/2012.

AGUILANIU, H.; GUSTAFSSON, L.; RIGOULET, M.; NYSTRÖM, T. Protein oxidation in G0 cells of *Saccharomyces cerevisiae* depends on the state rather than rate of respiration and is enhanced in pos9 but not yap1 mutants. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.35396–35404, 2001.

ALVES COSTA, J. R. M. **Padronização de metodologias para o uso de biomarcadores de contaminação ambiental em traíra (*Hoplias malabaricus*): parâmetros hematológicos, oxidativos e vitelogenina**. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ANDREWS, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 95–104, 2000.

ANVISA. "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Citação e referências a documentos eletrônicos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 12 dez, 2012.

ATES, B.; ORUN, I.; TALAS, Z. S.; DURMAZ, G.; YILMAZ, I. Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb²⁺ and Cu²⁺. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.34, p. 53-59, 2008.

ATLI, G., CANLI, M. Response of antioxidant system of fresh water fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd,Cu,Cr,Zn,Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.1884–1889, 2010.

AZEVEDO, F.A., CHASIN, A. A. M. As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia. São Carlos: Rima, p. 322, 2003.

BERNET, D., SCHIMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM P., WAHLI, T. Histopatology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Disease**, v. 22, p.25–34, 1999.

Bishop ML Fody, EP; Schoeff, LE. Clinical Chemistry - Techniques, Principles, Correlations. 6th ed. Lippincort Williams & Wilkins, a WoltersKluwer. Philadelphia. p. 528-529, 2010

BRANDÃO, F.D. **Identificação, quantificação e controle de defeitos em monocristais e nanopartículas de TiO₂**. Dissertação de mestrado em física, UFMG, Belo Horizonte, 2010.

BRIGGER I, DUBERNET C, COUVREUR P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.631–51, 2002.

CADIOLI, L. P. e SALLA, L. D., “Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia”, **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v.1, p.98-105, 2006.

CAIRNS Jr., J.; McCORMICK, P. V. & NIEDERLEHNER, B. R. A proposal framework for developing indicators of ecosystem health. **Hydrobiologia**, v.263, p.1-44, 1993.

CAPITANI E.M., PAOLIELLO, M.M.B., ALMEIDA, G.R.C. Lead sources of human exposure in Brazil. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.42, p.311-318, 2009.

CARVALHO, C. S., FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism. **Comparative and Biochemintry Physiology, Part A**, v.151, p.437- 442, 2008.

COMMANDEUR, J.N.M., STIJNTJES, G.J., VERMEULEN, N.P.E. Enzymes and transport systems involved in the formation anddisposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation anddetoxication mechanisms of xenobiotics. **Pharmacology Reviews**, v. 47, p.271-330, 1995.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE nº357. Citação e referências a documentos eletrônicos. Disponível em: <www.dcmmm.pucrio.br/download/Conama357.pdf> Acesso em: 12 dez, 2012.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, p.23–38, 2003.

DAWSON, N.G. Sweating the small stuff: environmental risk and nanotechnology. **Bioscience**, v.58, p.690, 2008.

DREYER, M. **Biomonitoramento de uma reserva particular do patrimônio Natural (rppn) através da aplicação de biomarcadores Bioquímicos, morfológicos e genéticos em *Astyanax* sp.** Dissertação de mestrado. Departamento de Ecologia e Conservação da UFPR, Curitiba, 2008.

DURAL, M., GOKSU, M. Z. L., OZAK, A. A. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. **Food Chemistry**, 102, p.415–421, 2007.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), 1982. Standards of performance for lead-acid battery manufacturing plants. U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations. Disponível em < <http://nepis.epa.gov>> acesso em dez/2012.

EPA, 2007. Nanotechnology White Paper. US Environmental Protection Agency Report EPA 100/B-07/001, Washington. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>> acesso em set/2012.

FENT, K. Ecotoxicology of organotins compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v.26, n.1, p.3-10, 1996.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BUSSOLARO, D.; FERRARO, M.V.M.; RANDI, M.A.F.; ALVES COSTA; J R.M.; CESTARI, M.M.; ROCHE, H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. **Toxicology In Vitro**, v.21, p.706-715, 2007.

FINK, K.B.; GÖTHERT, M. 5-HT Receptor Regulation of Neurotransmitter Release. **Pharmacological Reviews**, v.59, p.360-417. 2007.

FLORENCE TM. E BATLEY GE. Chemical Speciation in Natural Waters. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 9, p. 219-296, 1980.

FREIRE, M.M., SANTOS, V.G., GINUINO, I.S.F., ARIAS, A.R.L. biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.347-354, 2008.

FUKUSHIMA, A.R., AZEVEDO, F.A. História da Toxicologia. Parte I – breve panorama brasileiro. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.1, 2008.

GOMES, M. A. **Propriedades ópticas e estruturais dos nanocristais de Y_2O_3 puros e dopados com Eu^{3+} e Nd^{3+}** . Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe. 2009.

GUEDES, J. A., LIMA, R. F. S., SOUZA, L. C. Metais pesados em água do rio Jundiá - Macaíba/RN. **Revista de Geologia**, v. 18, p.131-142, 2005.

GRAINGER, D.W.; CASTNER, D.G. Nanobiomaterials and nanoanalysis: opportunities for improving the science to benefit biomedical technologies. **Advanced Materials**, v.20, p.867–877, 2008.

GURER-ORHAN, H.; SABÝR, H. U.; ÖZGÜNES, H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. **Toxicology**, v. 195, p. 147–154. 2004.

HANG,H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. P. 159-161, 2004.

HAI, D.Q., VARGA, I.S., MATKOVICS, B. Effects of an organophosphate on the antioxidant systems of fish tissues. **Acta Biologica Hungarica**. v.46, p. 39-50, 1995.

HURT, R.H.; MONTHIOUX, M.; KANE, A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. **Carbon**, v.44, p.1028–1033, 2006.

JIA, K., PAN, B., LVA, L., ZHANG, Q., WANG, X., PAN, B., ZHANG, W. Impregnating titanium phosphate nanoparticles onto a porous cation exchanger for enhanced lead removal from waters. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.331, p.453–457, 2009.

KAEGI, R., A ULRICH, B. SINNET, R. VONBANK, A WICHSER, S. ZULEEG, H. SIMMLER, S. BRUNNER, H. VONMONT, M. BURKHARDT, AND M. BOLLER, "Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment.," **Environmental pollution**, v 156, p. 233-239, 2008.

KAHRU, A., DUBOURGUIER, H. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**. v. 269, p. 105–119, 2010.

KAPPUS, H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. **Chemistry and Physics of Lipids** v.45, p.105-115, 1987.

KROLL, A., PILLUKAT, M.H., HAHN, D., SCHNEKENBURGER, J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.72, 370–377, 2009.

LIMA JUNIOR, R. G. S. ARAUJO, F. G. MAIA, M. F. BRAZ PINTO, A. S. Evaluation of Heavy Metals in Fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. **Environment Research**, v.89, p.171-179, 2002.

LIVINGSTONE. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

MACH, R. Nanoscale treatment of groundwater. Federal remedial technology roundtable: naval facilities engineering command. Disponível em: <http://www.frtr.gov/pdf/meetings/l-mach_09jun04.pdf, 2004.> acesso em: out/2012.

MELA, M., NETO, F. F., GRÖTZNER, S. R., RABITTO, I. S., VENTURA, D. F., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Localization of inorganic and organic mercury in the liver and kidney of *Cyprinus carpio* by autometallography. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**. v.7, n 2, 2012.

MENARD, A., DROBNE, D., JEMEC, A. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. **Environmental Pollution**. v.159, p.677-684, 2011.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M. G.; G. L. L. P.; CHAVES, I. S. CRAVO, M. F.; LIMA, J. V.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**. v. 146, p. 221-234, 2007.

MOREIRA, H.L.M. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ed. Ulbra. P23. 2001.

MOTTA, V. T. 2003. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4ªed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo, P.92-102.

MUELLER, N.C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environmental Science Technology**, v.42, p.4447–4453, 2008.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p.622–627, 2006.

NOWACK, B., BUCHELI, T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v.150, p.5–22, 2007.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology. An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p.823–839, 2005.

PANDEY, S. PARVEZ, S. ANSARI, R. A. ALI, M. KAUR, M. HAYAT, F. AHMAD, F. RAISUDDIN S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, v.174, p. 183–192, 2008.

PANYAM J, SAHOO S K, PRABHA S, BARGAR T, LABHASETWAR V. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly

(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle. **International Journal of Pharmaceutics**, v.262, p.1–11, 2003.

PAOLIELLO, M.M, DE CAPITANI, E.M. Occupational and environmental human lead exposure in Brazil. **Environmental Research**, v.103, p.288-97, 2007.

PASCHOALINO, M.P., MARCONE, G.P.S., JARDIM, W.F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, p.421-430, 2010.

PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assesment (1) Introduction. **Ecotoxicology**, v.3, p.157 – 160, 1994

PEROTTONI, J.; LOBATO, L. P.; SILVEIRA, A.; ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T. Effects of mercury and selenite on d-aminolevulinate dehydratase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. **Environmental Research**, v. 95, p. 166–173, 2004

PEREIRA, J.C. **Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões**. Dissertação Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, depto engenharia de materiais. 2010.

PRATT, D.S, KAPLAN, M.M. **Laboratory tests**. In Schiff ER, Sorell MF, Maddrey WC. Diseases of the Liver. Lippincott - Raven, Philadelphia, 8ª edição, vol. 1 1999; pp 205-244.

PTASHYNSKI, M. D., PEDLAR, R. M., EVANS, R. E., BARON, C. L., & KLAVERKAMP, J. F. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). **Aquatic Toxicology**. v. 58, p. 229–247, 2002.

RABITTO, I.; ALVES COSTA, J. R. M.; AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: histopatological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safty**, v. 60, p. 147–156, 2005.

RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B., VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 35, p. 1289-1303, 2000.

RAUNIO, S., TAHTI, H. Glutamate and calcium uptake in astrocytes after acute lead exposure. **Chemosphere**, v.44, p.355-359, 2001.

REBELLO, J. M. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e anti-tumoral de chalconas sintéticas**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

RECILLAS, S., GARCÍA, A., GONZÁLEZ, E., CASALS, E., PUNTES, V., SÁNCHEZ, A., FONT, X. Use of CeO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of lead from water: Toxicity of nanoparticles and derived compounds. **Desalination**, v. 277, p. 213-220, 2011.

REQUENA, J. R., LEVINE, R. L. AND STADTMAN, E. R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**, v.25, p.221-226, 2003.

ROESIJADI, G., ROBINSON, W.E. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. **Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. p. 387--420, 1994.

ROGERS, J. T.; RICHARDS, J. G.; WOOD, C. M. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic toxicology**, v. 64, p.215-234, 2003.

RONG ZHANG, YUJIE NIU, YAWEI LI, CHUNFANG ZHAO, BO SONG, YAO LI, YIKAI ZHOU. Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p.52-60, 2010.

ROVER, J. L., HÖEHR, N. F., VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quimica Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

SANTOS, M. L., LENZI, E., COELHO, A. R. Ocorrência de metais pesados no curso inferior do rio Ivaí, em decorrência do uso do solo em sua bacia hidrográfica. **Acta Science and Technology**, v. 30, p. 99-107, 2008.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SECCHI, G.C. ; ERBA, L. & CAMBIAGHI, G. Delta – aminolevulinic and dehydratase activity of erythrocytes and liver tissue in man. **Archives of Environmental Health**, v.28, p.130-2, 1974.

SLOMAN, K.A. LEPAGE, O. ROGERS, J.T. WOOD, C.M. WINBERG, S. Socially-mediated differences in brain monoamines in rainbow trout: effects of trace metal contaminants. **Aquatic Toxicology**. v.71, p.237–247, 2005.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. **Environmental Research**. p. 235-335, 1992.

SUN, H., ZHANG, X., ZHANG, Z., CHEN, Y., CRITTENDEN, J. C. Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite. **Environmental Pollution**, v. 157, p.1165–1170, 2009.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. New York, 1995.

TAPIA, J., DURAN, E., PENA-CORTES, F., HAUENSTEIN, E., BERTRAN, C., SCHLATTER, R. *Micropogonias manni* as a bioindicator for copper in Lake Budi (IX Region, Chile). **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.51, 901–904, 2006.

TEW, K. D.; RONAI, ZE'EV. GST function in drug and stress response. **Drug Resistance Updates**. v. 2, p.143–147, 1999.

TEPE, Y., TURKMEN, M. TURKMEN, A. Assessment of heavy metals in two commercial fish species of four Turkish seas. **Environmental Monitoring and Assessment**, v., p.277-284, 2007.

THE ROYAL SOCIETY AND THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. The Royal Society and the Royal Academy of Engineering. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. London, UK, 2004.

TORRES, M. C. L. SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, no. 2 , 2004.

TSENG, Y. C., CHEN, R. D., LUCASSEN, M., SCHMIDT, M. M., DRINGEN, R., ABELE, D., HWANG, P. P. Exploring Uncoupling Proteins and Antioxidant Mechanisms under Acute Cold Exposure in Brains of Fish. **Plos One**, v.6. 2011.

TURKMEN, A., TURKMEN, M., TEPE, Y., MAZLUM, Y., OYMAEL, S. Heavy metal levels in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) and Mullet (*Mugil cephalus*) in Iskenderun Bay (North Eastern Mediterranean, Turkey). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.77, p.186–193, 2006.

TURKMEN, M., TURKMEN, A., TEPE, Y., ATES, A., GOKKUS, K. Determination of metal contaminations in sea foods from Marmara, Aegean and Mediterranean seas: Twelve fish species. **Food Chemistry**, v.108, p.794–800, 2008.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13, p. 57-149, 2002.

VANCINI, R. L.; LIRA, C. A. B.; ABOULAFIA, B.; NOUAILHETAS, V. L. A. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. 2005. Citação e referências a documentos eletrônicos. Disponível em <www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf> Acesso em: 03 maio 2010.

VANZ, Argeu; MIRLEAN, Nicolai; BAISCH, Paulo. Avaliação de poluição do ar por chumbo particulado: Uma abordagem geoquímica. **Química Nova**. v.26, p.25-29. 2003.

VIARENGO, A., BURLANDO, B., CERATTO, N., PANFOLI, I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. **Cellular and Molecular Biology**, v.46, p.407–417, 2000.

VINK R, BEHRENDT H. E SALOMONS W. Development of the heavy metal pollution trends in several European Rivers: an analysis of point and diffuse sources. **Water Science and Technology**, v.39 p. 215-223, 1999.

WANG, D., HU, J., IRONS, D. R., WANG, J. Synergistic toxic effect of nano-TiO₂ and As(V) on *Ceriodaphnia dubia*. **Science of The Total Environment**, 2011. v. 409, p. 1351-1356.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. **Bulletin of the World Health Organization**, v.78, p.1068-1078, 2000.

WOOD, C. M., FARREL, A. P., BRAUNER, C. J. 2012. Homeostasis and toxicology of non-essential metals. *Fish Physiology*. v. 31B, p. 223.

WU, S.M. SHIH, M.J. HO, Y.C. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure,

Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology e Pharmacology, v. 145, p.218–226, 2007.

ZHANG, X., LIN, S., LU, X.-Q., CHEN, Z. Removal of Pb(II) from water using synthesized kaolin supported nanoscale zero-valent iron, **Chemical Engineering Journal**, v.163, p.243–248, 2010.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP RIMA Editora, 2006. 478 p.